



Cláudia Menegaz Zaccaron Cristiano

Blendas formadas por caseína e gelatina: efeito da adição de plastificante e de agente reticulante e interações com copolímeros

Florianópolis

2009

Cláudia Menegaz Zaccaron Cristiano

Blendas formadas por caseína e gelatina: efeito da adição de plastificante e de agente reticulante e interações com copolímeros

Tese submetida ao Curso de pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutora em Química.

Área de concentração: Físico-Química

Departamento de Química

Orientador: Dr. Valdir Soldi

Florianópolis

2009

*Aos meus pais Victor e Vaneide, ao meu irmão
Thiago, ao meu avô e padrinho Zeniro (in memoriam)
e ao meu marido Rodrigo*

AGRADECIMENTOS

Aos professores e funcionários da Universidade Federal de Santa Catarina por terem possibilitado minha formação acadêmica,

Ao orientador Dr. Valdir Soldi pela amizade e paciência,

Aos amigos e colegas do POLIMAT, especialmente Adriana Melo, Aline Lima, Aline Oliveira, Caroline pela amizade e Marly, Samira e Ledilege pela amizade e por terem auxiliado neste trabalho,

Ao professor Dr. Pedro Barreto do Depto de Ciências e Engenharia de Alimentos pelas análises de textura,

Ao professor Dr. Jamil Assreuy do Depto de Farmacologia e à mestranda Ângela Cristina Bet pelas análises de adesão celular e citotoxicidade,

Ao professor Dr. Celso Peres Fernandes do Depto de Engenharia Mecânica e ao aluno André Michel pelas medidas de ângulo de contato,

Ao mestrando Ismael Bellettini pelas medidas de fluorescência,

Aos membros da banca examinadora,

À Grace e ao Jadir da Secretaria de Pós-Graduação em Química,

Ao orientador Dr. Redouane Borsali que me recebeu na Université Joseph Fourier em Grenoble durante parte do meu doutorado, aos pesquisadores Cyrille Rochas e Isabelle Pignot-Paintrand, à secretária Isabelle Caldara e aos amigos Karoline, Windson, Shirley, Pollyanne e Fabianne,

Aos meus amigos, irmão, sogros e cunhados,

Aos meus pais e ao meu marido Rodrigo pelo constante incentivo, orientação e força dada nas horas mais desanimadoras e difíceis.

Ao CNPq e à Capes pelo suporte financeiro,

À todos que, de uma maneira ou outra, contribuíram para que fosse possível a conclusão desse trabalho.

INDICE

Lista de abreviações.....	i
Lista de tabelas.....	v
Lista de figuras.....	vi
Resumo	ix
Abstract.....	x
INTRODUÇÃO	1
1. Proteínas.....	1
1.1. Gelatina.....	2
1.2. Caseína.....	4
2. Polímeros sintéticos termossensíveis.....	6
3. Blendas poliméricas.....	9
4. Complexos intermacromoleculares.....	10
5. Plastificantes	11
6. Agentes reticulantes.....	14
7. Embalagens.....	16
8. Liberação controlada de fármacos	19
9. Engenharia de tecidos	26
OBJETIVOS	30
1. Objetivos Gerais.....	30
2. Objetivos Específicos.....	30
PARTE EXPERIMENTAL	32
1. Materiais	32
2. Determinação da massa molar da gelatina.....	33
3. Blendas formadas por gelatina/caseína.....	33
3.1. Preparação dos filmes	33
3.2. Determinação do grau de reticulação.....	34
3.3. Ensaio de intumescimento e de solubilidade	34
3.4. Determinação do ângulo de contato em água	35
3.5. Permeabilidade ao vapor de água	35
3.6. Absorção dos vapores de água.....	35
3.7. Microscopia eletrônica de varredura.....	36
3.8. Análise termomecânica.....	36

3.9. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos	37
3.10. Análise mecânica	37
3.11. Análise termogravimétrica.....	38
4. Aplicações dos filmes de gelatina e caseína	38
4.1. Coberturas comestíveis para maçãs	38
4.1.1. Determinação dos sólidos solúveis totais	38
4.1.2. Determinação do pH	38
4.1.3. Determinação dos parâmetros de textura	39
4.2. Liberação controlada de fármacos	39
4.2.1. Liberação do fármaco	39
4.3. Engenharia de tecidos	40
4.3.1. Preparo da cultura celular	40
4.3.2. Teste de citotoxicidade	41
5. Polímeros termosensíveis: estudos em solução e associação com as proteínas.....	41
5.1. Calorimetria diferencial de varredura	41
5.2. Fluorescência	42
5.3. Espalhamento de luz dinâmico	42
5.4. Microscopia eletrônica de transmissão	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
1. Determinação da massa molar da gelatina.....	44
2. Caracterização dos filmes de gelatina/caseína: efeito da adição de agente plastificante e reticulante	44
2.1. Determinação do grau de reticulação dos filmes	44
2.2. Solubilidade, intumescimento e medidas de ângulo de contato	45
2.3. Permeabilidade e absorção de vapores de água	47
2.4. Estudos de miscibilidade: morfologia e análise termomecânica	51
2.5. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos	55
2.6. Análise mecânica	57
2.7. Análise termogravimétrica.....	65
3. Aplicação dos filmes de gelatina/caseína	70
3.1. Revestimento de maçãs Fuji	70
3.2. Testes in vitro de liberação da p-hidroxiacetanilida e aplicação de modelos cinéticos	75
3.3. Testes de adesão celular.....	77

4. Estudo de misturas de polímeros em solução	78
4.1. Gelatina e caseína	78
4.2. Copolímeros	82
4.3. Proteínas e copolímeros	94
4.3.1. Proteínas/NIPAM _n -MPC _m -NIPAM _n	96
4.3.2. Proteínas/PNIPAM ₇₉ -PMPC ₁₅₀ -S-S-PMPC ₁₅₀ -PNIPAM ₇₉	103
CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

LISTA DE ABREVIACÕES

AA	Ácido ascórbico
AC	Ácido cítrico
A(t)	Distribuições do tempo de relaxação
b	Quantidade inicial de fármaco na solução
c	Concentração
Cas	Caseína
C_D	Concentração de fármaco na solução doadora
CMC	Concentração micelar crítica
Cp	Capacidade calorífica à pressão constante
C(q,t)	Função de auto-correlação
C_R	Concentração de fármaco na solução receptora
C1	PNIPAM ₈₁ -PMPC ₂₀₀ -PNIPAM ₈₁
C2	PNIPAM ₈₉ -PMPC ₂₅₀ -PNIPAM ₈₉
C3	PNIPAM ₉₀ -PMPC ₃₀₀ -PNIPAM ₉₀
C4	PNIPAM ₇₉ -PMPC ₁₅₀ -S-S-PMPC ₁₅₀ -PNIPAM ₇₉
d	Distância
D	Coeficiente de difusão
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMEM	Meio de cultura celular Eagle Modificado por Dulbecco
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
E	Elongação
EAB	4-aminobenzoato de etila
EDC	Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
Gel	Gelatina
GSH	Glutathione
HEMA	Metacrilato de hidroxietila
I/C	Intensidade de espalhamento de luz normalizado
$I(q)$	Intensidade de espalhamento em função da magnitude do vetor de espalhamento
J	Fluxo
k	Constante cinética

K	Constante específica
k_B	Constante de Boltzmann
k_H	Constante de Huggins
LCST	Menor temperatura crítica da solução
L_o	Comprimento original da amostra
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MP	Minimamente processado
M_t	Quantidade absoluta de fármaco liberada no tempo t
MY	Módulo de Young
M	Massa molar média
M_∞	Quantidade total de fármaco liberada no tempo infinito
n	Expoente de liberação
NHS	N-hidroxisuccinimida
NR	Medida não realizada
P	Coefficiente de permeabilidade
PBS	Tampão fosfato
PDPA	Poli(2-(diisopropilamina) metacrilato de etila)
PEG	Polietilenoglicol
p-HAA	p-hidroxiacetanilida
pI	Ponto isoelétrico
PMPC	Poli(2-(metacriloiloxi)etilfosforilcolina)
PNIPAM	Poli(N-isopropilacrilamida)
PPP	Polifosfazena
PVA	Permeabilidade ao vapor de água
q	Vetor de espalhamento
Q	Quantidade acumulada de fármaco permeado através da unidade de área
q_{\max}	Vetor espalhamento “ q ” para o máximo do pico de espalhamento
R	Razão molar
R_g	Raio de giração
R_H	Raio hidrodinâmico
S	Secção de área unitária

SAXS	Espalhamento de raios-X a baixos ângulos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Sorb	Sorbitol
SST	Sólidos solúveis totais
T	Temperatura
t	Tempo
T_b	Temperatura de transição vítrea da blenda
T_c	Temperatura crítica de agregação
T_g	Temperatura de transição vítrea
TGase	Transglutaminase
T_m	Temperatura de fusão
TMA	Análise termomecânica
$T_{máx}$	Temperatura de máxima velocidade de degradação
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico
TR	Tensão de ruptura
T_1	Temperatura de transição vítrea do polímero 1
T_2	Temperatura de transição vítrea do polímero 2
UR	Umidade relativa
x	Massa da amostra
W_t	Massa da amostra no tempo t
W_o	Massa da amostra seca
w	Fração mássica do polímero
a	Constante específica
α	Coeficiente linear de expansão térmica
dc / dx	Gradiente de concentração
$\frac{dL}{dT}$	Inclinação da curva de análise termomecânica
η	Viscosidade dinâmica
η_{red}	Viscosidade reduzida
η_{rel}	Viscosidades relativa
η_s	Viscosidade do solvente
η_{sp}	Viscosidade específica

$[\eta]$	Viscosidade intrínseca
ρ	Densidade da solução polimérica diluída
Γ	Frequência de relaxação
ν	Viscosidade cinemática
$\%I$	Porcentagem de intumescimento
$\% R$	Porcentagem de reticulação
$\%W$	Porcentagem do conteúdo de água absorvida
2θ	Ângulo entre o feixe incidente de raio X e o detector
λ	Comprimento de onda

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aminoácidos que compõem a gelatina	3
Tabela 2. Composição das caseínas	5
Tabela 3. Grau de reticulação dos filmes de gelatina/caseína	45
Tabela 4. Solubilidade, intumescimento e ângulo de contato dos filmes reticulados de gelatina/caseína	46
Tabela 5. Permeabilidade aos vapores de água obtidos para os filmes de gelatina/caseína analisados a UR 75 %	47
Tabela 6. Absorção dos vapores de água pelos filmes de gelatina e caseína após 24 h de equilíbrio	48
Tabela 7. Valores de Tg obtidos	54
Tabela 8. Propriedades mecânicas dos filmes nas UR 43, 75 e 94 %.....	59
Tabela 9. Parâmetros termogravimétricos obtidos para os filmes de gelatina/caseína analisados sob atmosfera inerte	66
Tabela 10. Parâmetros termogravimétricos obtidos para os filmes de gelatina/caseína analisados sob atmosfera oxidante	67
Tabela 11. Valores de SST e de pH obtidos	71
Tabela 12. Valores de firmeza e de fraturabilidade obtidos	72
Tabela 13. Valores de fluxo, coeficiente de permeabilidade e cinética de liberação da p-hidroxiacetanilida considerando o modelo da lei de potências (Eq. 6).....	76
Tabela 14. Cinética de liberação da p-hidroxiacetanilida através dos filmes reticulados considerando os modelos de ordem zero, primeira ordem e de Higuchi	76
Tabela 15. Valores de raio hidrodinâmico obtidos para soluções de gelatina e caseína	79
Tabela 16. Valores de raio hidrodinâmico obtidos para misturas de gelatina e caseína.....	80
Tabela 17. Características dos copolímeros formados por NIPAM-MPC analisados.....	82
Tabela 18. Valores de Tc e de Tg obtidos para os copolímeros via DSC.....	91
Tabela 19. Diâmetros médios obtidos para os copolímeros através de MET	93
Tabela 20. Valores de raio hidrodinâmico obtidos para diversas misturas de gelatina/copolímero a 20 e 40 °C	97
Tabela 21. Valores de raio hidrodinâmico obtidos para diversas misturas de caseína/copolímero a 20 e 40 °C.....	101
Tabela 22. Valores de raio hidrodinâmico obtidos para diversas misturas de proteína/C4 nas temperaturas de 20 e 40 °C	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica das estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas.....	2
Figura 2. Estruturas dos copolímeros (A) NIPAM _n -MPC _m -NIPAM _n e (B) NIPAM _n -MPC _m -S-S-MPC _m -NIPAM _n	7
Figura 3. Estrutura do sorbitol	12
Figura 4. Reticulação da gelatina pelo EDC.....	15
Figura 5. Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: convencional x controlada.....	20
Figura 6. Estrutura da p-hidroxiaacetanilida	25
Figura 7. Exemplo de curva carga-tempo gerada pelo analisador de textura	39
Figura 8. Célula de difusão utilizada para o estudo de liberação do fármaco	40
Figura 9. Imagens de gotas de água sobre a superfície dos filmes reticulados.....	47
Figura 10. Absorção de vapores de água (UR 75 %) em função da composição dos filmes de gelatina/caseína: (■) 100/0, (▲) 70/30, (●) 50/50, (▼) 30/70 e (◆) 0/100, (A) sistema puro, (B) sistema plastificado e (C) sistema reticulado	49
Figura 11. Absorção de vapores de água (UR 94 %) em função da composição dos filmes de gelatina/caseína: (■) 100/0, (▲) 70/30, (●) 50/50, (▼) 30/70 e (◆) 0/100, (A) sistema puro, (B) sistema plastificado e (C) sistema reticulado	50
Figura 12. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes (aumento 3000 x)	52
Figura 13. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da seção transversal dos filmes (aumento 3000 x)	53
Figura 14. Temperatura de transição vítrea dos filmes.....	55
Figura 15. Gráfico de Guinier dos filmes de gelatina e caseína	56
Figura 16. Curvas de SAXS obtidas para os filmes de gelatina/caseína	57
Figura 17. Valores de tensão de ruptura em função da composição dos filmes e da umidade relativa: (A) gelatina/caseína, (B) gelatina/caseína + sorbitol e (C) gelatina/caseína + EDC	62
Figura 18. Valores de elongação em função da composição dos filmes e da umidade relativa: (A) gelatina/caseína, (B) gelatina/caseína + sorbitol e (C) gelatina/caseína + EDC.....	63
Figura 19. Valores de módulo de Young em função da composição dos filmes e da umidade relativa: (A) gelatina/caseína, (B) gelatina/caseína + sorbitol e (C) gelatina/caseína + EDC	64
Figura 20. Derivadas das curvas termogravimétricas obtidas para os filmes de gelatina/caseína na ausência de aditivos (A), plastificados (B) e reticulados (C) analisados sob atmosfera inerte	68

Figura 21. Derivadas das curvas termogravimétricas obtidas para os filmes de gelatina/caseína na ausência de aditivos (A), plastificados (B) e reticulados (C) analisados sob atmosfera oxidante.....	69
Figura 22. Perfis de permeação da p-hidroxiacetanilida através dos filmes reticulados de gelatina/caseína em solução tampão pH 7,4 a 37 °C	75
Figura 23. Análise de MEV das células sob os filmes reticulados: (A) gel/cas 70/30 e (B) gel/cas 30/70 nos aumentos de (1) 500x e (2) 2000x.....	77
Figura 24. Distribuição dos modos de relaxação A(t) obtidos no ângulo de 90° a 20 °C: (A) concentração de gelatina mantida a 1,25 mg mL ⁻¹ e (B) concentração de caseína mantida a 1,25 mg mL ⁻¹	81
Figura 25. Intensidade de espalhamento de luz normalizado para a concentração I/C em função da temperatura obtida a 90° para o copolímero PNIPAM ₈₉ -PMPC ₂₅₀ -PNIPAM ₈₉ (C2) em solução aquosa.	83
Figura 26. Intensidade de espalhamento de luz normalizado de uma solução aquosa 0,25 mg mL ⁻¹ de PNIPAM ₈₉ -PMPC ₂₅₀ -PNIPAM ₈₉ (C2) obtida a 90°. Um tempo de equilíbrio de 25 min foi utilizado em cada intervalo de temperatura	84
Figura 27. Intensidade de espalhamento de luz normalizado de uma solução aquosa 0,25 mg mL ⁻¹ de PNIPAM ₈₉ -PMPC ₂₅₀ -PNIPAM ₈₉ (C2) obtida a 90° nas temperaturas de 35, 40 ou 50 °C.	85
Figura 28. Função de autocorrelação C(q,t) obtidas nos ângulos de 50 - 130° e distribuição dos tempos de relaxação A(t) a 90° para soluções de copolímero 2,50 mg mL ⁻¹ (A) C1, (B) C2, (C) C3 e (D) C4 a 20°C e a 40°C	86
Figura 29. Variação da frequência de relaxação em função de q ² para uma solução aquosa de copolímero a 2,50 mg mL ⁻¹ analisada a 20 e a 40 °C: (A) C1, (B) C2, (C) C3 e (D) C4.....	87
Figura 30. Relação entre a função de autocorrelação A(t) e os raios hidrodinâmicos obtidos para PNIPAM ₈₉ -PMPC ₂₅₀ -PNIPAM ₈₉ (C2) nas concentrações de: (A) 4,00 – 0,05 mg mL ⁻¹ a 20 °C e (B) 4,00 – 0,01 mg mL ⁻¹ a 40 °C	88
Figura 31. Valores de raio hidrodinâmico em função da concentração da solução de copolímero a: (A) 20°C e (B) 40°C.	89
Figura 32. Distribuição dos modos de relaxação A(t) a 90° e 40 °C em diferentes pH: (A) C1, (B) C2, (C) C3 e (D) C4.....	90
Figura 33. Microscopia eletrônica de transmissão obtida para os copolímeros a 20 °C e 40 °C.	92
Figura 34. Razão da intensidade I ₃ /I ₁ obtida a partir do espectro de emissão do pireno para todos os copolímeros a 40 °C e para o copolímero C1 a 20 °C	94

Figura 35. Modos de distribuição obtidos a 90° para soluções de (A) gelatina/C2 e (B) caseína/C2, ambos na concentração de 1,25 mg mL ⁻¹ /1,25 mg mL ⁻¹ obtidos a 20 °C em função da variação do tempo de mistura	95
Figura 36. Distribuição dos modos de relaxação A(t) a 90° obtidos para misturas de gelatina/C2 a (A, B) 20 °C e a (C, D) 40 °C.....	99
Figura 37. Distribuição dos modos de relaxação A(t) a 90° obtidos para misturas de caseína/C2 a (A, B) 20 °C e a (C, D) 40 °C.....	102
Figura 38. Distribuição dos modos de relaxação A(t) a 90° obtidos para misturas de gelatina/C4 a (A, B) 20 °C e a (C, D) 40 °C.....	105
Figura 39. Distribuição dos modos de relaxação A(t) a 90° obtidos para misturas de caseína/C4 a (A, B) 20 °C e a (C, D) 40 °C.....	107

RESUMO

Neste trabalho foram estudados filmes formados por gelatina e caseína na presença ou ausência do plastificante sorbitol e do agente reticulante cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) visando sua aplicação nas áreas de embalagens, liberação controlada de fármaco e adesão celular. Estudos em solução foram realizados para avaliar interações entre as proteínas e copolímeros à base de PNIPAM (poli(N-isopropilacrilamida)) e PMPC (poli(2-(metacriloiloxi) etilfosforilcolina)). O filme de gelatina apresentou o maior ângulo de contato, grau de intumescimento e porcentagem de reticulação. A permeabilidade aos vapores de água foi maior para os filmes de gelatina/caseína reticulados. Os filmes apresentaram apenas uma temperatura de transição vítrea e superfície com ausência de poros. A adição de sorbitol diminuiu os valores de tensão de ruptura e de módulo de Young dos filmes. Medidas de espalhamento de raios-X à baixos ângulos revelaram que o aumento da quantidade de caseína na mistura reduziu a distância entre os agregados. Filmes analisados sob atmosfera oxidante foram menos estáveis termicamente em relação aos degradados sob atmosfera inerte. Filmes na forma de revestimento comestível para maçãs Fuji foram analisados. A maioria das amostras apresentou um aumento da fraturabilidade com o armazenamento. Em estudos de liberação controlada, filmes de gelatina apresentaram mais rápida permeabilidade ao fármaco. Medidas de espalhamento de luz dinâmico foram utilizadas para monitorar a formação de complexos poliméricos. A auto-associação dos copolímeros também foi avaliada por microscopia e fluorescência. Copolímeros formados por NIPAM/MPC apresentaram transição de fase em 33,8 °C. Cinéticas de equilíbrio termodinâmico foram dependentes da temperatura. Os copolímeros mostraram redução do tamanho com o aumento do pH da solução. Misturas de gelatina 1,25 mg mL⁻¹ e copolímero apresentaram interações a 20 °C e a 40 °C. Nos sistemas contendo caseína e PNIPAM_n-PMPC_m-PNIPAM_n analisados a 40 °C foi observado, na maioria das misturas, interação hidrofóbica entre os componentes.

Palavras-chave: filmes, gelatina, caseína, sorbitol, EDC, PMPC e PNIPAM.

ABSTRACT

Films based on gelatin and casein in the presence or absence of sorbitol (plasticizer) and the cross-linking agent 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) were studied. Its application in the areas of packaging, drug-delivery systems and cell adhesion was evaluated. In addition, the interactions between the proteins and copolymers based on PNIPAM (Poly(N-isopropylacrylamide)) and PMPC (poly(2-(metacryloyloxy)ethylphosphorylcholine)) were studied in solution. The gelatin film presented the largest angle of contact, swelling degree and cross-linking percentage. Water vapor permeability was larger for films of cross-linked gelatin/casein. Films showed only one glass transition temperature and a surface with absence of porous. Addition of sorbitol decreased the values of tensile strength and the Young modulus of the films. Small angle X-ray scattering measurements revealed that the increase in the amount of casein in the mixture reduced the distance between the aggregates. Films analyzed under an oxidant atmosphere were less thermally stable than those decomposed under an inert atmosphere. Edible coatings for apples were analyzed. Most of samples presented an increase in the fractures with the storage. In drug delivery studies, gelatin films showed the fastest drug permeation. Dynamic light scattering were used to monitor the formation of polymeric complexes. Copolymer from NIPAM/MPC showed a phase transition at 33.8 °C. The self-assembly of copolymer was evaluated by fluorescence and microscopy measurements. Kinetics of thermodynamic equilibrium had a strong dependence on the temperature. The copolymers presented reduction in size with the increase of solution pH. Interactions in mixtures of gelatin 1.25 mg mL⁻¹ and copolymer at 20 °C and at 40 °C have been found. In the systems containing casein and PNIPAM_n-PMPC_m-PNIPAM_n at 40 °C have been found, in most of mixtures, a hydrophobic interaction between the components.

Keywords: films, gelatin, casein, sorbitol, EDC, PMPC and PNIPAM.

INTRODUÇÃO

1. Proteínas

Proteínas são poliamidas e suas unidades monoméricas são compostas por cerca de 20 diferentes α -aminoácidos. A ligação $-\text{CO}-\text{NH}-$ (amida) formada entre os aminoácidos é conhecida como ligação peptídica.¹ Os aminoácidos comuns são conhecidos como α -aminoácidos porque possuem um grupo amino primário e um grupo carboxílico como substituintes no mesmo átomo de carbono (α). A única exceção é a prolina, que possui um grupo amino secundário. Cada um dos 20 aminoácidos difere nas estruturas de suas cadeias laterais e conseqüentemente nas suas propriedades físicas e químicas.² O grupo lateral pode ser não-polar (hidrofóbico), polar sem carga (hidrofílico), positivamente ou negativamente carregado a pH 7.³

A exata sequência dos diferentes α -aminoácidos ao longo da cadeia de proteína é chamada de estrutura primária. Quando a estrutura primária está correta, a cadeia da poliamida “dobra” de maneira particular para dar uma forma necessária para sua particular tarefa. Este dobramento das cadeias de poliamida atinge níveis de complexidade chamados de estruturas secundárias e terciárias da proteína. A estrutura secundária é o arranjo espacial dos átomos de um esqueleto polipeptídico, sem levar em consideração a conformação de suas cadeias laterais.⁴ Estes arranjos são específicos e chamados de α -hélice ou folha β -pregueada.¹ Na folha β , as ligações de hidrogênio ocorrem entre polipeptídeos vizinhos e não no interior da cadeia como na α -hélice. As proteínas podem ainda apresentar estruturas não repetitivas ou aleatórias, ou seja, irregulares. A estrutura terciária descreve o dobramento dos elementos estruturais secundários e especifica as posições de cada átomo na proteína incluindo os das cadeias laterais.² A estrutura quaternária resulta quando a proteína contém um agregado de mais de uma cadeia de poliamida.¹ A Figura 1 representa as estruturas descritas acima. A estrutura das proteínas é estabilizada pelos efeitos hidrofóbicos e, em menor grau, por interações entre os resíduos polares e outros tipos de ligações, como as pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína.⁴

A elaboração de filmes de proteínas consiste na dispersão de macromoléculas em um solvente e no aquecimento e posterior espalhamento da solução sobre um suporte plano para a evaporação do solvente.⁵ A nível macromolecular este processo consiste na ruptura das ligações intermoleculares de baixa energia seguido de um arranjo e orientação das cadeias poliméricas para formar uma matriz tridimensional estabilizada por interações eletrostáticas, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio, entre outras.⁶ Entre os materiais protéicos formadores de filmes obtidos de fonte animal estão o colágeno, gelatina, proteína miofibrilar do peixe,

queratina, proteína do ovo, caseína e proteína do soro do leite. Entre os obtidos de plantas estão a zeína do milho, glúten do trigo, proteína da soja, do amendoim e do algodão.³

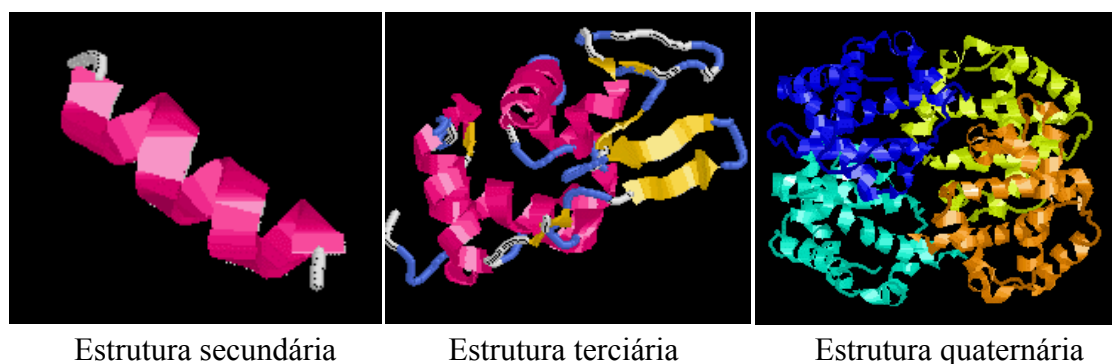


Figura 1. Representação gráfica das estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas.

1.1. Gelatina

A gelatina tem atraído atenção para o desenvolvimento de filmes devido a sua abundância e biodegradabilidade.⁷ Ela é formada por uma mistura de proteínas de elevada massa molar solúveis em água.⁸ A quantidade de cada tipo de aminoácido encontrado na gelatina é variável, pois depende da matéria-prima e dos processos utilizados para sua obtenção.⁹ A gelatina não é uma proteína nutricionalmente completa pois não contém triptofano e é deficiente em isoleucina, treonina e metionina.¹⁰ Também é deficiente ou não contém aminoácidos com enxofre (cisteína e cistina). O conteúdo de cinzas na proteína está na faixa de 0,1 a 3,25 %¹¹ e pode ser aceita em aplicações alimentares, enquanto a percentagem de água varia de 6 a 9 %¹² podendo chegar a 16 %.¹³ A Tabela 1 apresenta a composição dos aminoácidos que constituem a gelatina.¹⁴

A gelatina é uma proteína anfotérica com ponto isoelétrico (pI) entre 5 e 9 dependendo da matéria-prima e do método da manufatura.¹⁵ É obtida pela desnaturação do colágeno,¹⁶ que é a proteína mais comum do reino animal. Existem dois tipos principais de gelatina: o tipo A (pI de 7 a 9) é derivado do colágeno com pré-tratamento exclusivamente ácido enquanto o tipo B (pI de 4,8 a 5,2) resulta do pré-tratamento alcalino do colágeno. A gelatina do tipo A é comumente obtida de ossos ou couro de porco quando o animal não excede 6 meses de idade, conseqüentemente a reticulação do colágeno é mínima e este pode ser desnaturado pela acidificação a cerca de pH 4 e aquecimento a 50 °C. A gelatina do tipo B é geralmente derivada do couro ou osso bovino. Devido a maior idade do animal, é necessário pré-tratamento do colágeno com base, que hidrolisa algumas ligações do colágeno reticulado e as amidas ácidas.¹⁷

Considerando a origem, a gelatina obtida de peixe é distinguida das demais pelo seu baixo ponto de fusão, baixa temperatura de gelatinização e alta viscosidade da solução.¹⁸

Tabela 1. Aminoácidos que compõem a gelatina.

Aminoácido	Gelatina tipo A ^a	Gelatina Tipo B ^a
Lisina	2,7	2,8
Histidina	0,4	0,4
Arginina	4,9	4,8
Ácido aspártico	4,5	4,6
Treonina	1,8	1,8
Serina	3,5	3,3
Ácido glutâmico	7,3	7,2
Prolina	13,2	12,4
Glicina	33,0	33,5
Alanina	11,2	11,7
Cisteína	0	0
Valina	2,6	2,2
Metionina	0,4	0,4
Isoleucina	1,0	1,1
Leucina	2,4	2,4
Tirosina	0,3	0,1
Fenilalanina	1,4	1,4
Triptofano	0	0
Hidroxiprolina	9,1	9,3
Hidroxilisina	0,6	0,4

^a Número de resíduos de aminoácidos em base a 100 resíduos totais.

A gelatina é incolor ou ligeiramente amarela, transparente, frágil, inodora, solúvel em água quente, glicerol e ácido acético e insolúvel em solventes orgânicos.⁸ Apresenta também peculiaridades como biopolímero, tais como, presença dos grupos funcionais ácidos e básicos, capacidade de formar uma estrutura tripla-hélice específica não observada em polímeros sintéticos (esta estrutura é formada em soluções a baixas temperaturas) e apresenta estado vítreo em 205 - 210 °C, sendo resistente ao calor.¹⁹

Em sistemas aquosos a gelatina forma ligações de hidrogênio com a água devido a exposição de regiões polares, tornando-se intumescida. A formação do gel de gelatina é endotérmica e ocorre gradualmente.²⁰ O mais importante atributo da gelatina é a força do gel, que é determinada pelo método chamado força de Bloom. Esta é a força, em gramas, requerida para pressionar uma haste (de 12,5 mm de diâmetro) por 4 mm em um gel de gelatina 6,7% (m/v) a 10 °C.²¹ O Bloom de gelatinas comerciais variam de 90 a 300 g.²² Gelatinas com elevada força do gel (> 200 g) apresentam maior temperatura de fusão em relação às de menor Bloom.¹⁷

A gelatina apresenta um considerável número de aplicações: clarificante de bebidas²³ como sucos de vegetais e frutas (especialmente de maçã²⁴ e de pêra²⁵); agente espessante em iogurtes; na confecção de cápsulas de suplementos vitamínicos;²² alimentos e medicamentos;²⁶ em molhos e sopas instantâneas; filmes comestíveis para confeitos;²⁷ estabilizante de sorvetes, queijos e saladas de frutas²⁰ e na indústria têxtil.²⁸

1.2. Caseína

O leite é um complexo fluido biológico com elevada quantidade de proteínas, lipídios e minerais. O leite bovino contém aproximadamente 3,5 % de proteína, que são dividida em duas classes: a primeira, denominada caseína, representa cerca de 80 % das proteínas e é precipitada em pH 4,6 (pI) a 30 °C enquanto a segunda, denominada soro, representa cerca de 20 % das proteínas e é insolúvel sob as condições mencionadas. A fração restante é formada por glicoproteínas.²⁹

A caseína constitui o principal componente protéico no leite, como mencionado, e forma partículas coloidais estáveis de forma aproximadamente esférica conhecidas como micelas.³⁰ Esta auto-associação é dirigida por interações hidrofóbicas, mas as interações repulsivas eletrostáticas são também importantes pois definem o grau de polimerização e o limite de crescimento.³¹ Sabe-se que micelas de caseína variam de 50 à 300 nm de diâmetro³² e que quatro proteínas principais - α_{s1} (44 %), α_{s2} (13 %), β (33 %) e κ (10 %) - estão presentes nas micelas de leite bovino.³³ A Tabela 2 apresenta a composição destas caseínas³⁴ e mostra que esta é rica em lisina, um aminoácido essencial deficiente em muitas proteínas originadas de plantas.³

Entre as frações da caseína, a β -caseína é a mais hidrofóbica e a α_{s1} a mais hidrofílica.³ As α -caseínas são caracterizadas pela grande solubilidade na presença de cálcio e pela presença de peptídeos altamente fosforilados. A diferença entre as famílias α_{s1} e α_{s2} está baseada na sequência de aminoácidos.³⁵ A β e a κ -caseína são proteínas anfipáticas.³ A κ -caseína está presente principalmente na camada externa da micela.³⁶ A concentração de caseína no leite varia

de 10 a 100 g L⁻¹, dependendo da espécie. Valores menores são encontrados em leites de primatas, por exemplo 4,6 g L⁻¹ para leite humano, e maiores em leites de roedores. No leite bovino, a concentração de caseína é de 26 g L⁻¹.³⁵

Tabela 2. Composição das caseínas.

Aminoácido	α_{s1}	α_{s2}	β	K
Aspartato	7	4	4	3
Asparagina	8	14	5	8
Treonina	5	15	9	14
Serina	8	6	11	12
Serina-P	8	11	5	1
Glutamato	25	24	19	12
Glutamina	14	16	20	14
Prolina	17	10	35	20
Glicina	9	2	5	2
Alanina	9	8	5	15
Cisteína	0	2	0	2
Valina	11	14	19	11
Metionina	5	4	6	2
Isoleucina	11	11	10	13
Leucina	17	13	22	8
Tirosina	10	12	4	9
Fenilalanina	8	6	9	4
Lisina	14	24	11	9
Histidina	5	3	5	3
Triptofano	2	2	1	1
Arginina	6	6	4	5
Total (resíduos)	199	207	209	169
Massa molar (Da)	23614	25230	23983	19007

As caseínas apresentam baixo nível de estrutura secundária e terciária, provavelmente devido ao seu elevado teor de prolina, que rompe as α -hélices e as folhas β -pregueadas. As

ligações de hidrogênio e eletrostáticas e as associações hidrofóbicas facilitam a formação de interações intermoleculares que aumentam a coesão entre as cadeias para formar filmes.³⁷

Dois principais métodos são estabelecidos para a produção de caseína em escala industrial: (1) precipitação isoeletrica e (2) coagulação enzimática. No primeiro método, o leite é acidificado em pH 4,6 (pI) para induzir a coagulação da caseína. Na sequência a temperatura é ajustada para 30-40 °C, o coalho é lavado, prensado ou centrifugado (para remover o excesso de água) e finalmente seco e moído. A diferença entre os dois métodos está nos meios de coagulação. No segundo método, uma enzima cliva a κ -caseína, desestabilizando as micelas e promovendo a coagulação na presença de cálcio.³

A caseína é amplamente utilizada para promover a estabilidade física dos alimentos. A natureza anfipática destas proteínas, devido à mistura de resíduos de aminoácidos polares ou não, faz com que elas se concentrem nas interfaces ar-água ou óleo-água, reduzindo a tensão superficial ou interfacial e, conseqüentemente, reduzindo a energia mecânica requerida para formar espuma ou emulsão.³⁸ A caseína tem sido estudada como transportador de fármacos em microesferas,^{39,40} adesivos e coberturas⁴¹ e na forma de caseinato de sódio.³⁸

2. Polímeros sintéticos termossensíveis

Polímeros que podem responder a um estímulo externo com uma mudança em sua forma, solubilidade, formação de auto-associação e transição sol-gel tem atraído atenção no contexto de liberação de medicamentos, cultura celular e engenharia de tecidos.⁴² A temperatura é o estímulo externo mais utilizado nestes sistemas, seguida por luz, pH, campo elétrico, campo magnético e força iônica.⁴²⁻⁴⁵

Geralmente a solubilidade dos polímeros aumenta com a temperatura. Por outro lado isso não é observado com polímeros que apresentam menor temperatura crítica de solução (LCST) devido ao predomínio de interações hidrofóbicas. LCST é definido como a temperatura em que a solução polimérica sofre uma transição de fase do estado solúvel para um insolúvel, ou seja, da forma “random coil” para a forma globular ou colapsada.⁴⁶

A poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) em meio aquoso mostra respostas significativas à alteração da temperatura.⁴⁷ Abaixo de 32 °C este polímero é totalmente hidratado e apresenta conformação de cadeia estendida enquanto acima desta temperatura sua forma é compacta e extremamente desidratada.⁴⁸ A elevação da temperatura leva à associação das cadeias hidrofóbicas, tornando desfavorável a ligação de hidrogênio entre o polímero e a água.⁴⁹ Em

contraste, polímeros como o poli(2-(metacriloiloxi) etilfosforilcolina) (PMPC) não apresentam LCST e permanecem dissolvidos em solução aquosa em ampla faixa de temperatura.⁵⁰ O monômero zwitteriônico MPC é utilizado para melhorar a biocompatibilidade de superfícies de copolímeros que são altamente resistentes à adesão celular ou de bactérias.^{51,52}

Recentemente foram sintetizados copolímeros biocompatíveis e biossensíveis formados por $\text{NIPAM}_n\text{-MPC}_m\text{-NIPAM}_n$ (Figura 2A) através de polimerização radicalar por transferência de átomo. De acordo com os autores,⁵³ estes copolímeros triblocos podem ser dissolvidos em solução aquosa ou em tampão fosfato a 20 °C. Por outro lado, o NIPAM se torna hidrofóbico em temperaturas acima de 37 °C, originando um gel reversível devido a interações atrativas entre as cadeias e à formação de micelas. Em outro trabalho, o copolímero $\text{PNIPAM}_{80}\text{-PMPC}_{125}\text{-S-S-PMPC}_{125}\text{-PNIPAM}_{80}$ (Figura 2B) foi sintetizado através do uso de iniciador bifuncional baseado em dissulfeto.⁵⁴ Este copolímero também forma gel a 37 °C, mas neste caso uma dissociação irreversível poderia ser induzida pela adição de glutatona através da clivagem de ligações de dissulfeto.

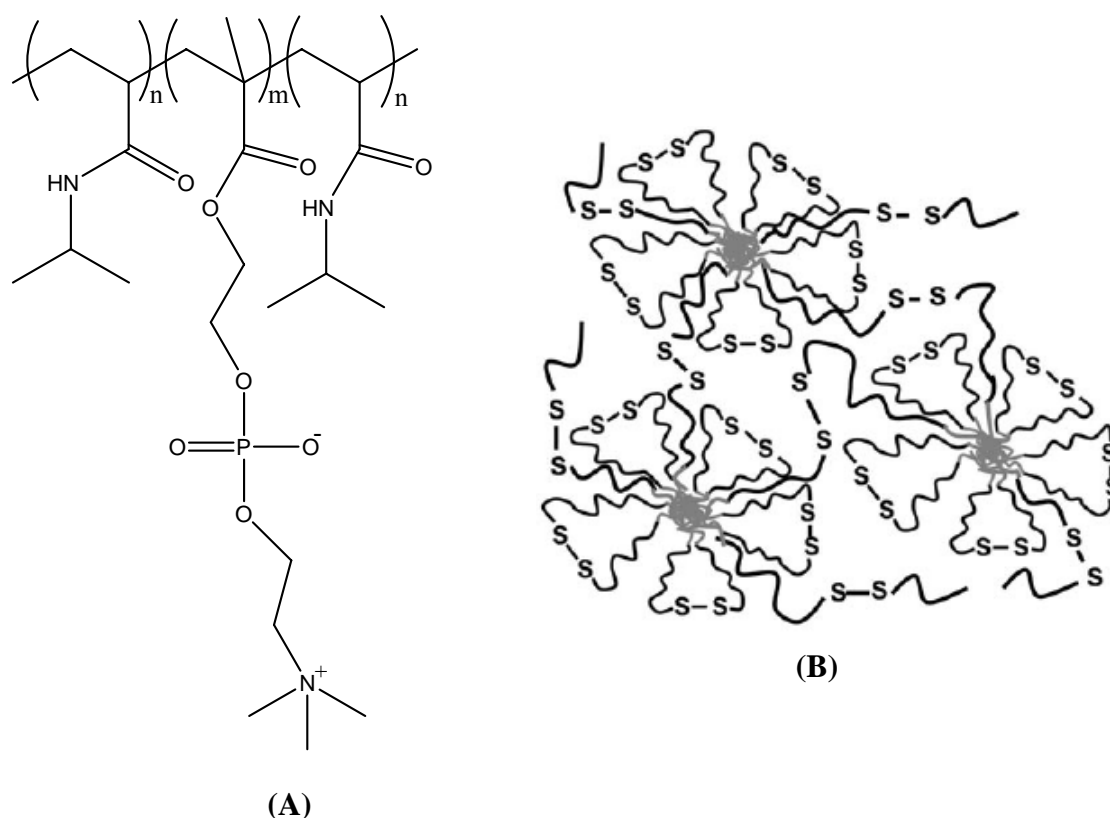


Figura 2. Estruturas dos copolímeros (A) $\text{NIPAM}_n\text{-MPC}_m\text{-NIPAM}_n$ e (B) $\text{NIPAM}_n\text{-MPC}_m\text{-S-S-MPC}_m\text{-NIPAM}_n$.

A literatura apresenta vários trabalhos sobre o preparo de micelas formadas por copolímeros contendo NIPAM. Entre eles, o poli(NIPAM-*b*-DL-lático) foi estudado através de medidas de espalhamento de luz dinâmico e os resultados indicaram que abaixo da LCST as partículas apresentaram diâmetros de ≈ 40 nm enquanto agregados foram observados acima desta temperatura.⁵⁵ Em outro estudo, poli(NIPAM-*co*-N-hidroximetilacrilamida) foi sintetizado e caracterizado, apresentando LCST em 40,5 °C, tamanhos na faixa de 25 - 34 nm e múltiplas morfologias, tais como formas cúbicas.⁵⁶ Copolímeros formados por poli(metacrilato de metila-*b*-NIPAM) foram sintetizados e o correspondente de menor massa molar apresentou tamanho de ≈ 10 nm até valores maiores de 1000 nm após a transição de fase do NIPAM (31 – 32 °C).⁵⁷ PNIPAM-*g*-polifosfazena também foi sintetizado e suas micelas apresentaram morfologia essencialmente esférica com diâmetro médio de 100 nm.⁵⁸ O fármaco adriamicin foi encapsulado pelos segmentos hidrofóbicos de micelas formadas por poli(NIPAM-*b*-metacrilato de butila).⁵⁹ Solução aquosa de copolímeros em bloco formados entre PNIPAM e PEG (polietilenoglicol) apresentaram solubilidade dependente da temperatura.⁶⁰ Poli(NIPAM-*co*-HEMA-lactato) (HEMA é o metacrilato de hidroxietila) apresentou um aumento no LCST devido a hidrólise do grupo lateral éster do lactato. Desta forma, a hidrofilicidade do poli(NIPAM-*co*-HEMA) foi aumentada e, independente da composição do polímero, a temperatura referente ao LCST foi de 31 °C.⁶¹ Partículas do copolímero enxertado formado por PNIPAM/EAB-PPP (EAB é o 4-aminobenzoato de etila e PPP é a polifosfazena) apresentaram LCST a 32,6 °C, concentração micelar crítica em 0,1 mg mL⁻¹ e diâmetro médio de 80 nm a 25 °C.⁶²

Por outro lado, copolímeros a base de MPC são utilizados na preparação de hidrogéis,⁶³ micelas⁶⁴ e vesículas⁶⁵. Entre os trabalhos relacionados a este homopolímero encontra-se a preparação de nanopartículas de ouro cobertas por PMPC.⁶⁶ Também foi avaliado o perfil de micelização do copolímero dibloco formado por PMPC e PDPA (poli(2-(diisopropilamina) metacrilato de etila), que é sensível ao pH. A auto-associação do copolímero PMPC-*b*-PDPA apresentou potencial para encapsulação do dipiridamol. Estudos confirmaram que os copolímeros apresentam forma de micelas esféricas, com raio hidrodinâmico de 15 nm para PMPC₃₀-*b*-PDPA₃₀ e de 29 nm para o PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀. O aumento da força iônica diminuiu o tamanho das micelas de PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ mas não apresentou efeito sobre o outro copolímero.⁶⁴ Vesículas formadas pelo polímero biocompatível PMPC-*b*-PDPA apresentaram raio hidrodinâmico de 80 nm a pH próximo de 6.⁶⁷ Copolímeros dibloco do tipo AB baseados em MPC e no termoresponsivo poli(óxido de propileno) apresentaram auto-associação em temperaturas elevadas.⁶⁸⁻⁷⁰

3. Blendas poliméricas

A mistura física de dois ou mais polímeros sem que haja reação química entre os componentes é denominada blenda polimérica.⁷¹ Estudos de blendas são realizados com o objetivo de melhorar as propriedades físicas dos materiais poliméricos.⁷² A propriedade obtida dependerá da natureza do polímero original, da forma de processamento da mistura, da faixa de composição dos componentes misturados e das interações entre eles. A síntese ou a modificação da estrutura química de um polímero existente também são alternativas para a obtenção de novos materiais. Entretanto, a mistura de dois ou mais polímeros representa uma alternativa mais econômica e rápida de se obter um novo material com propriedades intermediárias àquelas apresentadas pelos polímeros puros.⁷³

Os métodos convencionais para produção de blendas poliméricas são fusão e evaporação do solvente.⁷⁴ Blendas poliméricas são imiscíveis na maioria dos casos, tendendo a separar fases formando misturas heterogêneas.⁷³ Geralmente estas são compatibilizadas para atingir um desempenho satisfatório.⁷⁵ Blendas miscíveis são homogêneas, portanto apresentam uma única fase.⁷⁶ As interações específicas entre os segmentos dos polímeros impedem a separação de fases.⁷⁷ A interação molecular entre as cadeias poliméricas em uma blenda miscível é predominantemente do tipo secundária (intermolecular) como van der Waals, dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio.

Uma das formas mais simples utilizadas para caracterizar materiais obtidos a partir da mistura de polímeros é a avaliação da transparência. Geralmente as blendas miscíveis formam filmes translúcidos e as imiscíveis formam filmes opacos. Outro critério utilizado para avaliar a miscibilidade entre polímeros é a existência de uma única temperatura de transição vítrea (T_g), intermediária àquelas observadas nos polímeros puros. Medidas de DSC (calorimetria diferencial de varredura) são amplamente utilizadas para este fim.⁷⁸ A equação de Fox (1) pode ser utilizada para estimar os valores teóricos para as T_g 's de blendas poliméricas:

$$\frac{1}{T_b} = \frac{w_1}{T_1} + \frac{w_2}{T_2} \quad (1)$$

Na Equação acima, T_b , T_1 e T_2 denotam a T_g (em Kelvin) da blenda e dos polímeros 1 e 2, respectivamente enquanto w_1 e w_2 representam as frações mássicas dos correspondentes polímeros.⁷⁹

Entre os estudos relacionados à formação de blendas está o sistema formado por gelatina e quitosana. Os resultados indicaram que as blendas são imiscíveis. A justificativa pode ser dada

pela complexa estrutura dos polímeros e pela força secundária, responsável pela compatibilidade entre eles, que provavelmente não foi suficiente para sobrepor a repulsão entre os grupos NH_2 presentes em ambos os polímeros.⁸⁰ Em outro trabalho, blendas de gelatina e konjac glucomanana apresentaram miscibilidade através de ligações de hidrogênio. As blendas apresentaram maiores valores de tensão de ruptura que os polímeros puros, indicando a presença de interações intermoleculares.⁸¹ O sistema formado por caseína e celulose/cuoxam apresentou miscibilidade quando o conteúdo da proteína foi menor de 15 %. A miscibilidade entre os polímeros foi devido às interações entre os grupos hidroxilas da celulose e ligações peptídicas da caseína.⁸² Blendas de amido com várias proteínas (caseína, gelatina e albumina) também foram estudadas. Os filmes contendo caseína apresentaram uma menor velocidade de transmissão de vapor de água e maior tensão de ruptura.⁸³ O efeito plastificante da água nas blendas de gelatina/amilopectina mostrou redução na T_g .⁸⁴

4. Complexos intermacromoleculares

Complexos intermacromoleculares são obtidos através da interação de macromoléculas que apresentam grupos ionizados/ionizáveis de carga oposta. Podem apresentar também interações via ligação de hidrogênio, van der Waals e hidrofóbicas. Estes complexos apresentam potencial para desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, separação de proteínas e substitutos da pele.⁸⁵ As interações podem resultar na formação de precipitados, coacervatos, géis ou complexos solúveis.⁸⁶

Proteínas são polieletrólitos naturais que apresentam fortes interações com polieletrólitos sintéticos (poliíon ou neutro) ou naturais.⁸⁶ Complexos entre proteínas e polieletrólitos apresentam aplicação na área biomédica e tecnológica, tais como purificação⁸⁷ e biosensores,⁸⁸ e são geralmente avaliados por espalhamento de luz.⁸⁹ De acordo com esta técnica⁹⁰, não há formação de complexo entre os polímeros se o pico de espalhamento de luz estático obtido para a mistura é largo e localizado entre os picos obtidos pelos polímeros individuais. Na teoria pode ser observada uma distribuição bimodal no lugar do pico largo, mas o espalhamento de luz não consegue resolver a mistura de dois picos sobrepostos.

Para interação entre proteínas é necessário, a princípio, que as duas macromoléculas apresentem cargas opostas para que ocorra a associação polar. A interação eletrostática entre gelatina e caseína opostamente carregadas formou um agregado quando a razão molar (R) entre estes polímeros foi 1,26 (a eletroneutralidade foi atingida). Complexos solúveis podem ser formados quando $R \geq 10$, com dissociação parcial das micelas de caseína (0,2-0,3 μm).

Complexos formados por gelatina/caseína positivamente carregadas não apresentou interações quando os valores de R foram entre 0,02 e 0,63.⁹¹ A caseína apresenta regiões positivamente carregadas na superfície (resíduos 97–112 da k-caseína)⁹² que são importantes para uma possível complexação com a gelatina, quando esta é negativamente carregada. Por outro lado, gelatina e caseína também podem apresentar interação via ligação de hidrogênio.⁹³

A existência de interações coulômbicas fracas quando duas macromoléculas apresentam a mesma rede de cargas na superfície também tem sido avaliada. Esta interação é possível se o pH da mistura não estiver muito distante do ponto isoelétrico das proteínas, o que minimiza a repulsão eletrostática entre os grupos similarmente carregados.⁹⁴ Além disso, uma configuração favorável da cadeia de proteína é necessária para que ocorra este tipo de interação.

Estudos sobre a formação de complexo entre os polieletrólitos poli(estirenosulfonato de sódio) ou poli(2-acrilamida-2-metilpropanosulfonato) de sódio e gelatina (todas negativamente carregadas) foram realizados por medidas de espalhamento de luz. O raio de giração dos complexos aumentou em relação ao obtido para os polieletrólitos. Os resultados sugeriram que a complexação ocorreu por interação eletrostática, sendo a gelatina polarizada pelo campo elétrico da cadeia de polieletrólito. Este perfil não foi observado para outras soluções pelo fato de alguns grupos ionizáveis da gelatina serem inacessíveis devido a mudanças de conformação.⁹⁵

De acordo com a literatura, membranas à base de PNIPAM e gelatina reticulada foram sintetizadas e o transporte de 4-acetaminofen foi avaliado. O fluxo deste medicamento através da membrana aumentou quando a temperatura passou de 25 para 40 °C.⁹⁶ Estudos de espalhamento de luz mostraram que a formação de complexo entre a gelatina e PNIPAM foi completamente reversível. Os complexos com maior massa molar e densidade foram formados quando a razão mássica PNIPAM/gelatina esteve na faixa 1 – 2 a 32 °C.⁹⁰

A interação entre a caseína e o surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) foi avaliada e os resultados mostraram que moléculas individuais de SDS interagiram com a caseína através de interações hidrofóbicas. Medidas de espalhamento de luz dinâmico mostraram que a adição de SDS aumentou o tamanho dos complexos formados quando a concentração do surfactante foi superior a 4 mM. Por outro lado, a quantidade de monômeros de caseína (ou submicelas) aumentou quando a concentração de SDS foi acima de 10 mM.⁹⁷

5. Plastificantes

Plastificante é uma substância que apresenta elevada temperatura de ebulição e que, quando adicionado a outro material, altera as propriedades físicas e/ou mecânicas deste.⁹⁸ Isto

ocorre devido a diminuição das atrações intermoleculares entre as cadeias poliméricas adjacentes aumentando, por consequência, a mobilidade destas e a flexibilidade do filme. Também podem ocasionar mudanças significativas nas propriedades de barreira.⁹⁹ Filmes de proteínas são geralmente frágeis, desta forma plastificantes podem ser adicionados para competir pela ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas com as cadeias de proteínas.³ Entre os plastificantes mais utilizados estão o polietilenoglicol, glicerol, sorbitol, manitol e propilenoglicol. Outros plastificantes empregados são a sucrose,¹⁰⁰ água,¹⁰¹ triacetina,¹⁰² uréia¹⁰³ e citrato de trietila.¹⁰⁴

O sorbitol é um álcool polihídrico com uma elevada temperatura de ebulição. Apresenta solubilidade em água e miscibilidade com proteínas.¹⁰⁵ É encontrado em frutas e algas marinhas e empregado em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentos. Sua estrutura está representada na Figura 3.

Assim como outros polímeros, a gelatina é plastificada para aumentar sua elasticidade, diminuir sua temperatura de transição vítrea e modificar outras características físico-químicas. A compatibilidade da gelatina em soluções aquosas com álcoois polihídricos como glicerol, propilenoglicol e sorbitol é ilimitada e estes são utilizados para modificar a dureza dos filmes.¹⁹

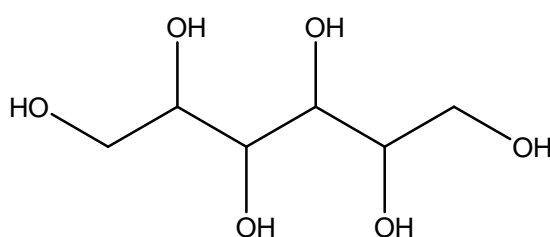


Figura 3. Estrutura do sorbitol.

De acordo com a literatura, vários trabalhos foram realizados sobre o efeito de plastificantes em filmes de gelatina ou caseína. A degradação térmica de filmes de gelatina na presença ou ausência de sorbitol foi avaliada. A presença do plastificante reduziu a energia de ativação e a temperatura inicial de degradação. A diminuição da estabilidade térmica foi associada ao efeito do sorbitol sobre as ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares da proteína.¹⁰⁵

A tensão de ruptura de filmes de gelatina/caseína/glicerol aumentou com a adição de gelatina (de 12,14 para 35,49 MPa). Os filmes de gelatina/glicerol apresentaram a menor permeabilidade ao vapor de água, provavelmente devido ao grau de organização da rede protéica (maior empacotamento) em relação à caseína. Esta organização foi conferida através de microscopia eletrônica de varredura. O filme de caseína apresentou estrutura lisa enquanto a

gelatina apresentou estrutura fibrosa, provavelmente responsável pela maior tensão de ruptura e elasticidade e menor permeabilidade ao vapor de água (PVA) obtidos.¹⁰⁶ Em outro trabalho, a adição de glicerol também alterou propriedades dos filmes de gelatina (flexibilidade, tensão de ruptura e sensibilidade à umidade). As mudanças nestas propriedades físicas foram atribuídas ao fato do plastificante reduzir as interações entre as cadeias adjacentes no biopolímero, permitindo um aumento de mobilidade.¹⁰⁷

O efeito dos plastificantes glicerol, propilenoglicol, dietilenoglicol e etilenoglicol à várias concentrações foram avaliados em filmes de gelatina. De acordo com os resultados, todos os plastificantes apresentaram compatibilidade com a gelatina (não apresentaram separação de fases).¹⁰⁸

Os plastificantes água e/ou polióis foram adicionados aos filmes de gelatina/quitosana¹⁰⁹ e de gelatina/amido hidroxipropila¹¹⁰ e as propriedades físicas foram estudadas. Aumentando a quantidade de plastificante houve uma considerável redução do módulo de elasticidade e tensão de ruptura e aumento da elongação. No geral, a presença de polióis diminuiu a Tg e a temperatura de fusão (Tm) e aumentou a velocidade de permeação de gás e vapor de água proporcional ao conteúdo de plastificante.

A presença de sorbitol diminuiu a Tg, o módulo de Young e a tensão de ruptura do filme de caseinato de sódio. O aumento do conteúdo de sorbitol nos filmes diminuiu a temperatura de máxima degradação.¹¹¹ Filmes de caseína plastificados com sorbitol apresentaram maior tensão de ruptura que os plastificados com glicerol. Isto foi atribuído a menor natureza hidrofílica do sorbitol comparado ao glicerol, que absorve mais umidade servindo como um plastificante adicional.¹¹²

A permeabilidade ao oxigênio e ao vapor de água e propriedades mecânicas de filmes de caseína-CO₂, caseinato de cálcio e caseína acilada foram determinadas em função da umidade relativa, temperatura e plastificantes (glicerol e glicerol: polipropilenoglicol 3:1). A permeabilidade ao oxigênio e ao vapor de água de filmes plastificados com glicerol foram maiores que os plastificados com polipropilenoglicol. De acordo com os resultados, os autores sugeriram que os filmes foram afetados por mudanças no volume livre das proteínas induzidas pela escolha do plastificante ou umidade relativa.¹¹³ Filmes formados por β -caseína e glicerol também foram estudados. A estocagem não afetou a permeabilidade ao vapor de água e a elongação dos filmes.¹¹⁴

6. Agentes reticulantes

Uma alternativa para melhorar o desempenho do filme é modificar a rede polimérica através da reticulação das cadeias. Mesmo um pequeno número de ligações cruzadas entre as cadeias é suficiente para impedir a separação destas e sua passagem para a solução. Se o grau de reticulação em um polímero é relativamente baixo, as moléculas do solvente podem penetrar na fase polimérica e desta forma, o polímero reticulado pode sofrer um intumescimento limitado. Com o aumento da densidade de reticulação, a capacidade de absorção do solvente diminui.⁷⁹ A massa molar do polímero tende ao infinito à medida em que é formada uma interconexão total entre as entidades poliméricas. Energias elevadas (ligações primárias fortes) mantêm as cadeias presas e definem uma condição de termorrígidos.¹¹⁵

A presença de grupos funcionais reativos na cadeia lateral da proteína faz o processo de reticulação possível através de tratamentos químico, físico ou enzimático. Entre os agentes químicos utilizados para a reticulação covalente de proteínas estão o glutaraldeído, gliceraldeído, formaldeído e o glioxal. Entre os tratamentos físicos estão a irradiação UV e γ e entre as enzimas, a transglutaminase (TGase).¹⁰⁶ Uma outra alternativa de reticulação pelo processo físico é o tratamento de soluções de proteínas com calor, que ocasiona sua desnaturação devido a quebra da ligação dissulfeto intramolecular. Como resultado, ocorre a reticulação da proteína devido a formação intermolecular da ligação dissulfeto.³

A reticulação aumenta a estabilidade térmica e mecânica e controla a degradação *in vivo*.¹¹⁶ Na seleção de um agente reticulante é importante considerar a sua toxicidade. O cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), utilizado neste trabalho, apresenta as vantagens de não ser incorporado na estrutura da proteína reticulada e de não ser tóxico em comparação a reticulantes como formaldeído e glutaraldeído.¹¹⁷ Além de proteínas, o EDC também é utilizado para reticular polissacarídeos.¹¹⁸

No processo de reticulação, o EDC é protonado e reage com o grupo carboxila da gelatina para formar a o-isoaciluréia. Na sequência ocorre um ataque nucleofílico das aminas na gelatina adjacente, gerando a reticulação e simultaneamente liberando o derivado de uréia gerado pelo EDC (Figura 4).¹¹⁹ A reticulação com a carbodiimida induz a formação de uma ligação amida ou peptídica entre os grupos amino primário e ácido carboxílico. Esta reação envolve aminoácidos da lisina, hidroxilisina, ácido aspártico e ácido glutâmico da gelatina, por exemplo. Um método utilizado para quantificar a extensão da reticulação envolve o uso de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) que reage com grupos amino primários.¹²⁰

De acordo com a literatura, filmes de gelatina/quitosana foram reticulados com EDC e plastificados com glicerol e a permeabilidade a vapores de água, propriedades mecânicas e solubilidade foram avaliadas. A presença de glicerol alterou as propriedades mecânicas e não aumentou a PVA.¹²¹ A efetividade do tratamento de filmes de gelatina/quitosana com EDC foi comparada à reticulação utilizando TGase. Os filmes modificados com TGase foram mais solúveis que os modificados com EDC pelo fato deste ativar os grupos hidroxilas da quitosana que pode reagir com os grupos aminas da proteína.¹¹⁸

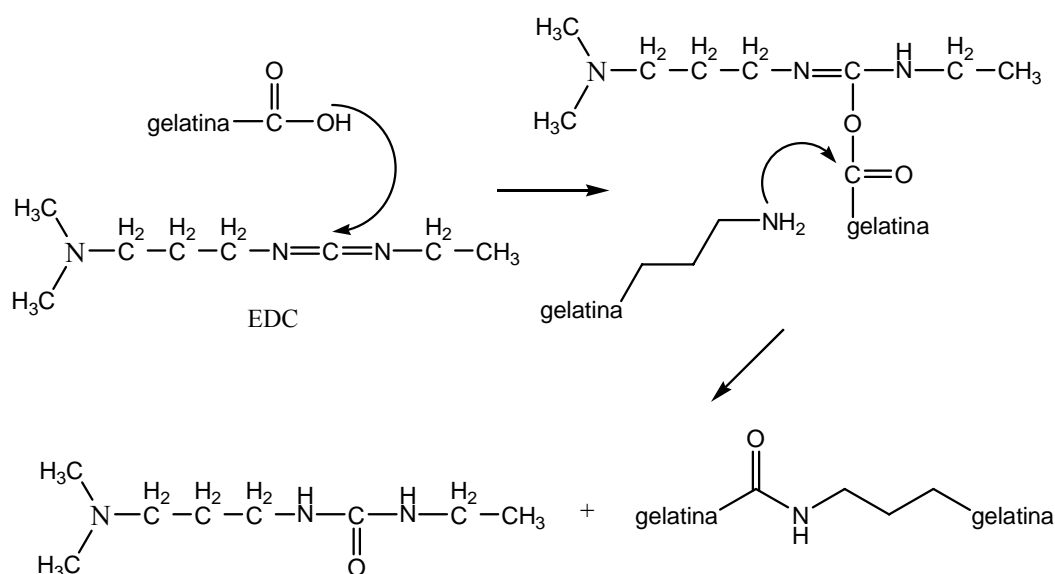


Figura 4. Reticulação da gelatina pelo EDC.

Estruturas macroporosas formadas por gelatina/hialuronato de sódio reticulados com EDC também foram estudadas. Medidas de infravermelho e de microscopia eletrônica de varredura auxiliaram na caracterização.¹²²

Hidrogéis de gelatina foram reticulados com EDC e genipina e foi observado que a carbodiimida pode formar ligações intra- e intermoleculares na proteína.¹²³

A enzima TGase foi utilizada para reticular os filmes de caseína e gelatina. A mistura destas proteínas produziu um efeito sinérgico sobre os filmes, com o maior efeito observado para a caseína/gelatina 75/25, onde a elongação passou de 27,23 % (sem TGase) para 56,79 % (na presença de TGase). Propriedades de barreira e morfológicas também foram avaliadas.¹⁰⁶ As propriedades de filmes de gelatina reticulados com TGase, glioxal e glutaraldeído foram avaliadas e as modificações químicas confirmadas pela diminuição no número de grupos amino livres.¹²⁴ Outros trabalhos relataram a reticulação da gelatina com glutaraldeído^{125,126} ou genipina^{127,128}

A solubilidade do caseinato de sódio dependeu da extensão da reticulação com TGase.¹²⁸ Em outro trabalho, foram adicionados TGase e glutathione (GSH) ao leite. Especialmente a κ -caseína da superfície micelar reagiu com a GSH.¹²⁹ Filmes de caseína reticulados com TGase apresentaram boa tensão de ruptura (quando a concentração de caseína foi superior a 3 %) e alongação de 72 %.¹³⁰

A caseína também foi reticulada com formaldeído e sua estabilidade térmica foi estudada por viscosidade e análise termogravimétrica.¹³¹ Além destes, a caseína foi reticulada com acrilonitrila, n-metacrilato de butila¹³² e por irradiação.¹³³

7. Embalagens

Materiais plásticos para embalagem surgiram em substituição aos materiais tradicionais como vidro, folha de flandres, alumínio e papel, devido à facilidade para moldagem, manuseamento, inovação e baixo custo.¹³⁴ Entretanto, a poluição ambiental ocasionada por polímeros sintéticos tem assumido proporções perigosas¹³⁵ pelo fato de serem extremamente estáveis, permanecendo intactos por longo tempo e não entrando de imediato no ciclo de degradação.¹³⁶ Como resultado, tem-se incluído biodegradabilidade aos polímeros através de modificação em sua estrutura.¹³⁵ Outra alternativa é a utilização de biofilmes, ou seja, filmes flexíveis formados a partir de macromoléculas biológicas como as proteínas e os polissacarídeos.¹³⁷ Enquanto não é possível a total substituição de embalagens sintéticas, filmes de biopolímeros têm o potencial de reduzir e substituir filmes sintéticos em algumas aplicações.⁹⁹

A aplicação de revestimentos comestíveis para prolongar o tempo de prateleira dos alimentos não é recente. O revestimento de laranjas e limões com cera para evitar a desidratação foi utilizado pelos chineses nos séculos XII e XIII.¹³⁸ Estes revestimentos diminuía a perda de água e inibiam a troca de gases naturais da respiração, provocando a fermentação do fruto.

Nos últimos cinquenta anos, vários estudos têm sido realizados nesta área¹³⁹ com destaque para os alimentos minimamente processados (MP), ou seja, frutas ou hortaliças que passam pelas operações de seleção, lavagem, descascamento e corte visando obter um produto apropriado.¹⁴⁰ A vida útil destes produtos varia de 7 a 20 dias quando armazenadas à temperatura adequada.¹⁴¹ Entre as frutas MP mais estudadas está a maçã,¹⁴²⁻¹⁴⁵ sendo a Fuji uma das cultivares mais plantada no Brasil. A sua significativa aceitação pelo mercado consumidor deve-se ao fato destas frutas apresentarem sabor adocicado, polpa crocante e suculenta e do grande

potencial de armazenamento, que pode durar até 6 meses em ar refrigerado ou 8 meses em atmosfera controlada.¹⁴⁶

Geralmente, filmes comestíveis são definidos como uma camada fina e contínua de material comestível.¹⁴⁷ A funcionalidade e desempenho de filmes comestíveis e coberturas dependem de suas propriedades de barreira e mecânicas (tensão, alongamento, etc.), que dependem da composição do filme e de seu processo de formação.⁹⁹ Em relação às condições de estocagem e distribuição, fatores como temperatura, umidade relativa e intensidade de luz a que o produto está exposto deverão ser considerados quando se deseja selecionar um material de embalagem.¹⁴⁸ Outra propriedade interessante nos biofilmes, especialmente quando destinados à embalagem de alimentos, é a propriedade ótica (opacidade).¹³⁷ Estes filmes podem controlar umidade, gases, migração de lipídios e ser usados como transportadores de aditivos e nutrientes.¹⁴⁹ O efeito da aplicação de revestimentos comestíveis nas características dos alimentos deve ser cuidadosamente analisado, pois a modificação da atmosfera interna pode ocasionar distúrbios associados às elevadas concentrações de dióxido de carbono e reduzidas concentrações de oxigênio.¹⁵⁰

Embalagens para alimentos também são planejadas para proteger o produto contra contaminações (microbiológicas e químicas) e deve prevenir a migração de seus próprios componentes para o alimento, constituindo uma barreira inerte entre o alimento e o ambiente. Por outro lado, há estudos envolvendo embalagens ditas “ativas”, pois apresentam interações desejáveis com o produto, aumentando ou monitorando seu tempo de prateleira.¹⁵¹

Filmes biodegradáveis/comestíveis são preparados basicamente a partir de polissacarídeos (celulose e derivados, alginato, pectina, amidos e derivados), proteínas (gluten, zeína, proteína da soja e do arroz, albumina, proteína do leite e gelatina) e lipídios (ceras, acilgliceróis e ácidos graxos).¹⁵² Entre estes materiais, as proteínas são estudadas devido a sua relativa abundância, habilidade de formar filmes, possibilidade de complementar o valor nutricional do alimento¹⁵³ e geralmente apresentam propriedades mecânicas e de barreira melhores que os polissacarídeos. Isto porque as proteínas têm uma estrutura específica baseada em 20 diferentes monômeros, que fornece uma ampla faixa de funcionalidade, como já mencionado. Entretanto, a pouca resistência ao vapor de água dos filmes de proteína e sua tensão mecânica menor em relação à polímeros sintéticos limita sua aplicação em embalagens para alimentos. Os revestimentos lipídicos são geralmente usados por sua excelente barreira a umidade, porém apresentam algumas desvantagens em relação à estabilidade (susceptibilidade a oxidação) e características sensoriais (sabor e textura às vezes desagradáveis).¹⁵¹ O caráter polar das proteínas determina as propriedades de barreiras de seus filmes. Os filmes de proteínas

apresentam elevada permeabilidade à substâncias polares (vapor de água) e baixa permeabilidade à substâncias não polares (oxigênio, aromas e óleos). Os plastificantes geralmente aumentam a permeabilidade de filmes de proteínas para substâncias polares ou não.³

Além do grau de permeabilidade ao oxigênio e ao dióxido de carbono provido pelo revestimento comestível, alguns produtos químicos são necessários para evitar a perda da qualidade das frutas. Os principais compostos utilizados em produtos MP são os antioxidantes, acidulantes e agentes quelantes. O uso de antioxidantes evita o escurecimento dos tecidos, a perda do aroma e do sabor, bem como as mudanças na textura e a redução da qualidade nutricional. São utilizados o ácido ascórbico e seus sais de cálcio e potássio e o ácido cítrico, entre outros, que atuam como doadores de hidrogênio, evitando a oxidação de compostos fenólicos presentes no vegetal. O ácido ascórbico é normalmente utilizado em conjunto com o ácido cítrico para manter o pH do meio mais estável (mais ácido),¹⁵⁴ além de ser seguro, barato e de elevar o teor de vitamina C nas frutas. De acordo com a literatura, maçãs Fuji fatiadas e tratadas com 2 % de ácido ascórbico apresentaram redução do escurecimento e aumento da vida útil.¹⁵⁵ Maçãs MP submetidas a tratamento com ácido ascórbico, ácido cítrico e cloreto de cálcio também apresentaram redução do escurecimento enzimático.¹⁵⁶

O uso de acidulantes abaixa o pH do produto, que passam a atuar como agentes fungicidas, sendo o ácido cítrico, o málico, o láctico e o tartárico os mais utilizados. O ácido cítrico é um dos principais ácidos orgânicos naturais em frutos e sua atividade antimicrobiana é devida à sua capacidade quelante de íons metálicos, os quais são essenciais para o crescimento microbiano.¹⁵⁴

Entre os parâmetros normalmente avaliados em estudos com frutas estão os sólidos solúveis totais (SST) e o pH. O teor de SST geralmente aumenta com o transcorrer do processo de maturação dos frutos, seja pela biossíntese, degradação de polissacarídeos ou perda de água, resultando em maior concentração dos mesmos. A perda varia com a taxa de respiração, já que os sólidos são substratos utilizados no processo respiratório.¹⁵⁷ Aproximadamente 99% dos sólidos solúveis do suco de maçãs correspondem aos açúcares solúveis e o restante a ácidos orgânicos, sais inorgânicos e outras moléculas.¹⁵⁸ Os açúcares solúveis mais abundantes no suco de maçãs são frutose, glicose e sacarose e, em menor proporção o sorbitol.¹⁵⁹

A acidez de um fruto é dada pela presença dos ácidos orgânicos que servem de substrato para a respiração. Muitos dos ácidos são voláteis, que compõem o aroma característico dos frutos. O conteúdo de ácidos orgânicos diminui gradualmente durante a maturação e armazenagem dos frutos devido à sua oxidação no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, em

decorrência do processo respiratório ou da conservação de açúcares, pois nesta fase ocorre maior demanda energética pelo aumento do metabolismo.¹⁶⁰

Entre os parâmetros de textura são normalmente avaliados a firmeza e a fraturabilidade. A firmeza da polpa refere-se ao grau de dureza da fruta. É um fator que pode influenciar o período de conservação e a resistência ao manuseio, ao transporte e ao ataque de microorganismos. A fraturabilidade é a força total usada para comprimir a amostra que apresenta resistência à deformação.^{161,162}

Inúmeros estudos têm sido publicados sobre caracterização das propriedades funcionais de biofilmes à base de proteínas. Trabalhos avaliaram a elaboração de filmes comestíveis de gelatina e estudaram as propriedades mecânicas em função do pH e da concentração de sorbitol,¹⁶³ da espessura do filme com sorbitol¹⁶⁴ e as propriedades térmicas de filmes de gelatina/amido em função dos plastificantes sorbitol, glicerol ou sucrose.¹¹⁰

As propriedades mecânicas, óticas e de intumescimento de filmes de gelatina/proteína isolada de soja foram investigadas. A tensão de ruptura, alongação, módulo de Young e intumescimento aumentaram com o conteúdo de gelatina na mistura. Os autores sugeriram a utilização dos compósitos formados como filme comestível.¹⁶⁵

Filmes baseados em caseína são atrativos para aplicações em alimentos devido a sua elevada qualidade nutricional, excelentes propriedades sensoriais e mecânicas e proteção de produtos alimentares.¹⁶⁶ Entre os trabalhos encontrados na literatura, filmes de caseína com monoglicerídeos acetilados foram utilizados para estender o tempo de prateleira de frutas e vegetais processados.¹⁶⁷ Filmes e coberturas comestíveis foram produzidos com proteínas do leite, que podem retardar a perda de umidade, apresentam boa barreira ao oxigênio, tensão de ruptura, são flexíveis¹⁶⁸ e transparentes.¹⁶⁹ A PVA, a estrutura dos filmes e as propriedades mecânicas foram avaliadas em filmes de β -caseína e glicerol. A β -caseína é a proteína mais hidrofóbica do leite, por isso espera-se a menor PVA entre elas.¹⁷⁰

8. Liberação controlada de fármacos

Numerosas investigações tem sido realizadas com o objetivo de buscar um modelo ideal de sistemas de transporte de medicamentos com alta especificidade e atividade sem efeitos tóxicos.¹⁷¹ Este empenho por parte de pesquisadores se justifica, pois sistemas de liberação controlada de fármacos oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos, tais como:

- Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco;

- Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- Não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bioinativação prematura);
- Administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses);
- Direcionamento a alvos específicos;
- Redução de custos devido à diminuição da quantidade de fármaco empregado.

A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo entre sistemas convencionais e de liberação controlada pode ser melhor visualizado na Figura 5. Nas formas de administração convencionais (spray, injeção, pílulas) a concentração do fármaco na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina. Desde que cada fármaco possua uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático se a dose efetiva estiver próxima à tóxica. O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem.¹⁷²

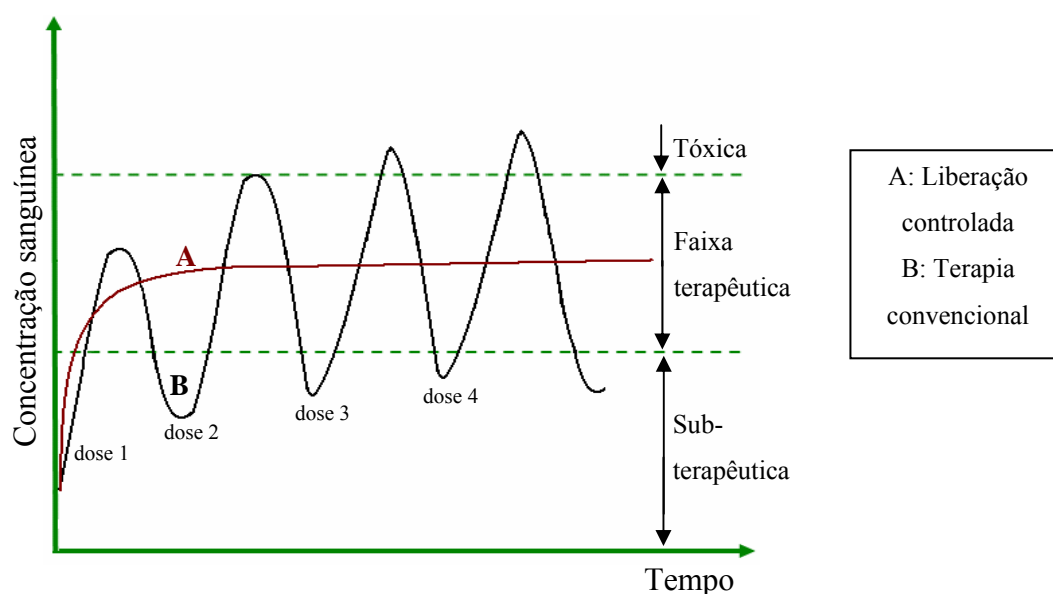


Figura 5. Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: convencional x controlada

Os sistemas de liberação controlada de fármaco podem apresentar-se de diversas maneiras, como por exemplo, através de comprimidos ou microesferas para ingestão oral, filmes, cremes, pomadas, géis, nanoesferas, soluções e suspensões para uso oftalmológico, matrizes

porosas para implantes, micelas e bandagens. Entre eles, o desenvolvimento de sistemas transdérmicos tem gerado interesse, visto que é uma cômoda e eficiente via de administração de medicamentos que consiste na aplicação de uma forma farmacêutica sobre a pele com conseqüente liberação do fármaco contido. Após a permeação cutânea, o fármaco atinge regiões mais profundas (tecidos subjacentes) ou a corrente sangüínea para uma ação sistêmica. Como vantagens desta via pode-se citar:

- É uma alternativa ao trato gastrointestinal, quando este é contra-indicado por algum motivo;
- Evita o efeito de primeira passagem hepática;
- Permite controlar a absorção de determinada quantidade de fármaco e sua aplicação em diferentes locais do corpo;
- Aumenta a adesão do paciente ao tratamento, devido a facilidade de administração e diminuição da toxicidade sistêmica.¹⁷³

A função barreira do estrato córneo, o intervalo de tempo entre a administração e o alcançar a concentração terapêutica, a possibilidade de irritação local e de desencadear tolerância e/ou resistência constituem, no entanto, desvantagens desta via de administração.

Com o objetivo de, por um lado, ultrapassar os problemas devidos à impermeabilidade da pele e à variabilidade biológica e, por outro, de aumentar o número de fármacos candidatos ao desenvolvimento de medicamentos transdérmicos, vários métodos para remover reversivelmente a resistência desta barreira da pele têm sido investigados, entre os quais, a utilização de promotores de permeação. Outros métodos para aumentar a liberação de fármacos na pele baseiam-se na modificação físico-química de fármacos com capacidade de permeação fraca em pró-fármacos que permeiem a pele com facilidade, ou, mais recentemente, a utilização de métodos elétricos, tais como a iontoforese e a sonoforese (aplicação de ultrassom).¹⁷⁴

Existem duas maneiras do fármaco se encontrar no suporte polimérico. No sistema matricial, o fármaco está disperso homogeneamente na matriz polimérica ou adsorvido na superfície e a sua liberação ocorre por difusão pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou seu intumescimento ou por uma combinação destes mecanismos.¹⁷⁵ O predomínio de um destes processos depende invariavelmente das propriedades do polímero empregado no sistema.¹⁷⁶ Se a velocidade de degradação do polímero for inferior à difusão da droga pela matriz, sua liberação inicial é dependente de sua difusão pelo sistema.¹⁷⁵ A estrutura cristalina de um polímero tem maior grau de empacotamento molecular e, portanto, tende a resistir mais à difusão de um fármaco em relação a polímeros amorfos com a mesma estrutura química. As propriedades de superfície (como a hidrofiliabilidade) determinam a capacidade de sorção de água

de polímeros que sofrem intumescimento. Por outro lado, materiais usados por longo tempo (implantes ortopédicos e dentários) devem ser repelentes à água para evitar degradação ou processo de erosão que conduz para modificações na dureza e menor resistência mecânica. Propriedades de superfície podem ser melhoradas por meios químicos, físicos e biológicos para aumentar sua biocompatibilidade.¹⁷⁷

No sistema do tipo reservatório, o fármaco está em uma cavidade central envolta por uma membrana polimérica que controla sua taxa de liberação. Mudanças na natureza e espessura dessa membrana promovem alterações na velocidade de liberação. No sistema reservatório composto por polímeros não-biodegradáveis a liberação do fármaco ocorre apenas por difusão através da membrana.¹⁷⁵ Entre os polímeros utilizados no sistema reservatório estão os derivados de celulose e os siloxanos.¹⁷⁸

O coeficiente de difusão é um parâmetro empregado para avaliar a eficiência de uma membrana em controlar a passagem de um fármaco de um meio para outro. A difusão de uma substância através de uma membrana é o principal meio de liberação de fármacos através de estruturas poliméricas tais como filmes e microesferas. Este processo também é conhecido como a tendência que as moléculas apresentam de migrar de uma região de concentração elevada para outra região de concentração baixa e é consequência direta do movimento browniano (movimento ao acaso).

A quantidade M de material fluindo através de uma secção de área unitária S de uma barreira por unidade de tempo é conhecido como fluxo J (Eq. 2), que por sua vez é proporcional ao gradiente de concentração, dc/dx (Eq. 3):

$$J = \frac{dM}{S \cdot dt} \quad (2)$$

$$J = -D \left(\frac{dc}{dx} \right)_t \quad (3)$$

onde D corresponde ao coeficiente de difusão em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, c é a concentração em g cm^{-3} (ou moles) e x é a espessura do filme. O sinal negativo da equação, que é conhecida como primeira lei de Fick, significa que a difusão ocorre na direção oposta ao aumento de concentração. Este modelo apresenta limitações e só pode ser aplicada quando o coeficiente de difusão for constante a uma determinada temperatura, ou seja, independente da concentração.¹⁷⁹

Nos experimentos de difusão, a solução contida no compartimento receptor da célula é constantemente removida e substituída pela solução de solvente para manter a concentração do fármaco baixa. Este procedimento é denominado de condição *sink* e evita que o sistema de difusão entre em equilíbrio, uma vez que as concentrações do fármaco tendem a se igualar no

lado doador e receptor da célula depois de um certo tempo de difusão. Desta forma a Equação 4 pode ser simplificada para a Equação 5:¹⁸⁰

$$Q = P(C_D - C_R)t \quad (4)$$

$$Q = PCet \quad (5)$$

onde Q é a quantidade acumulada de fármaco permeado através da unidade de área, P é o coeficiente de permeabilidade, C_D e C_R são as concentrações de fármaco na solução doadora e receptora, respectivamente e t é o tempo.

Apesar da complexidade dos fenômenos envolvidos na liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos, alguns modelos bem conhecidos são usados para analisar a liberação da substância ativa a partir destes sistemas. O modelo matemático que melhor descreve a cinética de dissolução das formulações é selecionado após a construção das curvas e análise da regressão linear, tomando-se apenas os pontos que correspondem à fase ascendente das mesmas. Uma formulação de liberação prolongada ideal é aquela em que o fármaco é liberado constantemente do início ao fim, seguindo um modelo cinético de ordem zero. Porém, na prática nem sempre se alcança uma cinética com este perfil. Muitas vezes as formulações de liberação prolongada seguem o modelo cinético proposto por Higuchi, enquanto as formulações de liberação imediata geralmente seguem o modelo de primeira ordem.¹⁸¹

O modelo cinético denominado lei de potência (Eq. 6) é utilizado para descrever a liberação do soluto quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não-Fickiano).¹⁸² Neste modelo, a relação entre a velocidade de liberação e o tempo é igual a:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (6)$$

em que M_t representa a quantidade absoluta de fármaco liberada no tempo t e M_∞ a quantidade total de fármaco liberado no tempo infinito; k é uma constante cinética, que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo, e n é o expoente de liberação que, de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco. No caso de filmes, valores de $n < 0,5$ pode ser indicativo que o principal mecanismo de liberação do fármaco seja associado a difusão parcial através de uma matriz intumescida e através dos poros hidrofílicos. Valores de n entre 0,5 e 1 indicam uma sobreposição do fenômeno de difusão e erosão conhecido como transporte anômalo ou não-Fickiano. Este comportamento é comum em polímeros que apresentam intumescimento limitado devido ao relaxamento das cadeias. Quando o valor encontrado para n for 1, a liberação do fármaco a partir da matriz é independente da

concentração, o que corresponde a uma cinética de liberação de ordem zero. Valores > 1 (super caso II) estão associados a mecanismos de difusão, erosão, relaxamento das cadeias e intumescimento.¹⁸³

O modelo conhecido como cinética de ordem zero (Eq. 7) baseia-se na liberação lenta da substância ativa a partir de formas farmacêuticas que não se desagregam:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_o t + b \quad (7)$$

Nesta equação, k_o é uma constante cinética e b é a quantidade inicial de fármaco na solução. O significado e o mecanismo da liberação inicial rápida (“burst effect”) não foram ainda completamente esclarecidos e nenhuma teoria que descreva este fenômeno foi até agora desenvolvida com sucesso. Na ausência de um tempo de latência ou de uma liberação inicial rápida, o valor de b torna-se zero. Esta relação foi utilizada para descrever a liberação de fármacos por vários tipos de formas farmacêuticas de liberação controlada.¹⁸⁴ Geralmente as preparações destinadas a veicular substâncias ativas segundo liberação prolongada apresentam um perfil de liberação de ordem zero, onde a velocidade de difusão do fármaco é menor que a respectiva velocidade de dissolução, permitindo a liberação constante do fármaco.¹⁸⁵ Este modelo indica que o fluxo independe da concentração do fármaco e é característico de formulações com doses infinitas.¹⁸⁶

As formas farmacêuticas que seguem a cinética de primeira ordem liberam uma quantidade de fármaco proporcional à quantidade restante no seu interior, por unidade de tempo, de modo que a quantidade de fármaco liberada vai diminuindo.¹⁸⁴

$$\ln \frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t \quad (8)$$

Nesta Equação, k_1 é a constante de liberação de ordem um. A cinética de liberação de fármacos apresenta-se na forma de uma exponencial (primeira ordem), provavelmente devido à difusão do fármaco da matriz polimérica para o meio e/ou à erosão da matriz polimérica liberando o fármaco.¹⁸⁷

Outro modelo proposto baseia-se na Equação de Higuchi¹⁸⁸ (Eq. 9), freqüentemente utilizada para descrever a velocidade de liberação controlada do fármaco a partir de um sistema matricial:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \sqrt{t} + b \quad (9)$$

onde k_H corresponde à constante de liberação de Higuchi. De acordo com este modelo, o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão é baseado na lei de Fick e dependente da raiz quadrada do tempo. Porém, o uso desta relação em sistemas que intumescem pode ser insuficiente, pois sistemas deste tipo podem sofrer erosão e deve-se atender ao atributo do relaxamento das cadeias poliméricas para o transporte do fármaco. Assim, a Equação de Higuchi apresenta fortes limitações na interpretação dos mecanismos de liberação controlada, porém é mais realista que o modelo de ordem zero.

Para a utilização confiável do modelo de Higuchi, o sistema em questão deve apresentar algumas características tais como:¹⁸⁹ i) a concentração inicial do agente ativo no sistema deve ser muito maior que a solubilidade deste agente ativo no polímero; ii) o intumescimento e a dissolução da matriz polimérica devem ser negligenciáveis; iii) a difusividade do agente ativo deve ser constante; iv) e durante a liberação, devem ser mantidas as condições *sink*.

O fármaco modelo utilizado neste trabalho foi o paracetamol (p-hidroxiacetanilida, Figura 6), amplamente utilizado como analgésico e antipirético.¹⁹⁰ Normalmente o paracetamol é administrado em doses de 0,5-1,0 g a cada 3-4 hs. A frequência da dosagem sugere o desenvolvimento de formulações para liberação controlada.¹⁹¹

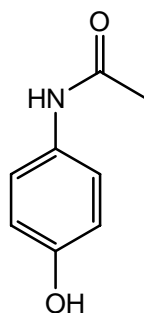


Figura 6. Estrutura da p-hidroxiacetanilida.

Entre os trabalhos já desenvolvidos nesta área está o da produção de filmes de gelatina/alginato reticulados com cálcio para estudos de liberação de hidrocloreto de ciprofloxacina. As propriedades químicas, mecânicas e morfológicas e os fatores que influenciam a liberação foram estudados. Os melhores valores de tensão de ruptura e de alongação foram obtidos na blenda com 50 % de cada componente. A liberação do fármaco modelo aumentou com o conteúdo de gelatina no filme, devido a dissolução da mesma e a conseqüente formação de poros.¹⁹²

Filmes de gelatina e carragena foram estudados na liberação oftalmológica de uma fármaco anti-glaucoma. Os resultados de liberação em fluido lacrimal ou em água mostraram que a liberação no filme de gelatina foi mais rápida, provavelmente devido a ausência de interações com o fármaco.¹⁹³

Hidrogéis de gelatina e sulfato de chondroitina reticulados com EDC e NHS (N-hidroxisuccinimida) foram avaliados em sistemas de liberação controlada de duas proteínas bactericidas. Ambas apresentaram liberação similar. Os hidrogéis apresentaram biocompatibilidade e degradaram em aproximadamente 18 semanas após a implantação.¹⁹⁴ Hidrogel baseado em quitosana/gelatina reticulado com glutaraldeído foram estudados na liberação de levamisole, cimetidina e cloranfenicol.¹⁹⁵ Além destes, outros trabalhos relatam a liberação de fármacos à partir de microesferas de gelatina reticuladas com gliceraldeído¹⁹⁶ e de cápsulas de gelatina/hidroxipropilmetilcelulose ou gelatina/goma guar.¹⁹⁷

Em relação à caseína, os trabalhos encontrados nesta área estão relacionados à microesferas. Estudos de liberação oral com microesferas de caseína foram preparadas pela reticulação com glutaraldeído em estudos de liberação de progesterona.¹⁹⁸

9. Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos consiste na reconstrução de novos órgãos e tecidos. A técnica envolve a expansão *in vitro* de células viáveis do paciente doador sobre suportes de polímeros bioreabsorvíveis. O suporte degrada enquanto um novo órgão ou tecido é formado. No desenvolvimento e na seleção desses materiais, o tempo de degradação é fundamental para o sucesso do implante.¹⁹⁹ Muitas terapias médicas atuais podem ser melhoradas através da engenharia de tecidos, com significativa redução de custo¹¹⁵ e da necessidade de transplante de órgãos.²⁰⁰ Nenhum órgão ou tecido está excluído deste campo de pesquisa multidisciplinar. Enquanto as células proliferam, a matriz é degradada, reabsorvida ou metabolizada.²⁰¹ Os poli(α -hidróxi ácidos) representam a principal classe de polímeros sintéticos bioreabsorvíveis e biodegradáveis utilizados na engenharia de tecidos.¹⁹⁹ Os primeiros exemplos de engenharia de tecidos datam de 1933, quando Bisceglie revestiu células tumorais de ratos em uma membrana polimérica e implantou numa cavidade abdominal de embriões de pintinhos.²⁰¹

Em função do tempo de permanência no corpo humano, os implantes podem ser classificados em dois grupos: permanentes ou temporários. Implantes permanentes quase sempre geram fenômenos crônicos de inflamação, sendo uma resposta tipicamente benigna a um corpo estranho, e que podem conduzir a complicações clínicas mais severas, como a contração dos

tecidos. Desde a década de 1960, implantes temporários, confeccionados a partir de polímeros bioreabsorvíveis ganharam importância na área médica, sendo utilizados em um amplo número de aplicações no corpo humano, tais como: suturas cirúrgicas, sistemas para liberação controlada de fármacos, *stents* e dispositivos ortopédicos. Os polímeros apresentam grande potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e apresentam características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos. Atualmente fazem parte do cotidiano dos centros cirúrgicos no mundo inteiro. Embora muitos dispositivos protéticos artificiais estejam disponíveis, poucos podem substituir completamente todas as complexas funções biológicas. Em situações clínicas mais severas somente o transplante do órgão retoma as atividades orgânicas.¹⁹⁹

No casos da aplicação em engenharia de tecidos, os polímeros devem:

- Suportar crescimento de novo tecido;
- Guiar a resposta tissular;
- Favorecer a fixação e proliferação celular;
- Controlar a resposta inflamatória e imunológica.

A adesão celular em um biomaterial está relacionada a fase de anexação, que ocorre rapidamente e envolve eventos como ligações físico-químicas entre as células e o material através de interações iônicas e forças de van der Waals. Na sequência ocorre a fase de adesão, que envolve diversas moléculas biológicas como proteínas de matriz extracelular, de membrana celular e do citoesqueleto, que interagem conjuntamente para induzir a transdução do sinal, promovendo a ação de fatores de transcrição e consequentemente regulando a expressão gênica.²⁰²

Os biopolímeros utilizados em dispositivos biomédicos e como veículo para liberação de fármacos devem ser empregados em condições assépticas. Vários processos de esterilização utilizados para este fim incluem o uso de pressões e temperaturas elevadas; de ondas eletromagnéticas de elevada energia (raios X, raios gama, etc); de gases como o óxido de etileno ou a filtração com membranas contendo poros submicrométricos. Apesar destes processos já estarem bem consolidados, deve-se tomar cuidado com sua utilização em biopolímeros, pois estes são passíveis de degradação quando submetidos a situações de energia elevada. Pressão hidrotérmica e temperaturas elevadas podem levar à processos de degradação térmica ou hidrolítica. Ondas eletromagnéticas também podem causar clivagem das cadeias poliméricas ou reticulação. Desta forma, o uso do óxido de etileno é um dos mais recomendados. No entanto há a necessidade de extremo cuidado na desgaseificação do biomaterial esterilizado com óxido de etileno, pois a presença deste dissolvido em implantes causa toxicidade.

Até o momento, a maioria das peles artificiais comercialmente desenvolvidas tem utilizado polímeros biodegradáveis como o colágeno, a quitina e a poli-L-leucina. Vários trabalhos foram encontrados na literatura sobre a utilização da gelatina em engenharia de tecidos, enquanto o oposto foi observado para a caseína. Esponjas baseadas em gelatina foram formadas através de dois processos de reticulação: (1) polimerização radicalar do metacrilato introduzido nas cadeias da gelatina e (2) com a enzima TGase. O primeiro processo permitiu a produção de esponjas com a estrutura porosa melhor definida e, conseqüentemente, mais apropriada para a cultura e hepatócitos.²⁰³

Em outro trabalho, poros foram formados em esponjas de gelatina através do intumescimento e liofilização da solução de gelatina reticulada com glutaraldeído. Os resultados sugeriram que a porosidade pode ser controlada pelos tamanhos de cristais de gelo formados durante o congelamento. Também foi enfatizado a ausência de aditivos ou solventes orgânicos neste processo.²⁰⁴

Misturas de gelatina e l-carragenana reticulados por glutaraldeído foram preparados. De acordo com as análises, a adesão e o crescimento celular não dependeram da adição de l-carragenana.²⁰⁵

Esponjas de gelatina/ácido hialurônico foram reticuladas com EDC. A porosidade aumentou com o conteúdo de ácido hialurônico. As esponjas foram implantadas no tecido conectivo subcutâneo de ratos. Testes revelaram boa biocompatibilidade e baixa antigenicidade para engenharia de tecidos.²⁰⁶

Esponjas de gelatina/hialuronato de sódio reticuladas em EDC apresentaram grau de reticulação de 10-35%, porosidade de 35-67% e tensão de ruptura de 10-30 gf/cm². A porosidade aumentou com o conteúdo de hialuronato de sódio. Sulfadiazina de prata foi impregnada na esponja, que foi aplicada à pele dorsal de ratos. Resultados mostraram um aumento na cicatrização do ferimento.¹²²

Esponjas formadas por gelatina e alginato foram preparadas e reticuladas com EDC. Liberação de fármaco *in vitro* e *in vivo* e testes de degradação foram avaliados para confirmar a aplicabilidade das esponjas em ferimentos.²⁰⁷

Filmes multicamadas formados por poli(cloreto de dialidimetilamônio)/gelatina apresentam vantagens sobre os formados por quitosana/gelatina em relação ao crescimento de fibroblastos. Através de microscopia de força atômica foi observada uma diminuição da espessura do filme contendo quitosana devido a sua decomposição por perda de interação eletrostática, o que pode explicar o desprendimento e o baixo espalhamento das células.²⁰⁸ Membranas baseadas em caseinato e proteína de soja foram estudadas. Os materiais não

apresentaram toxicidade sobre células, podendo aumentar sua proliferação. O efeito de tratamentos químico (reticulação com glioxal e ácido tânico) e físico (calor) foi avaliado.²⁰⁹ Hidrogéis compostos de poli(álcool vinílico) e caseína reticulados foram preparados e caracterizados para utilização como biomaterial.²¹⁰

OBJETIVOS

1. Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho é a preparação e a caracterização de filmes formados por gelatina e caseína na presença ou ausência de plastificante ou agente reticulante para aplicação em embalagens, liberação controlada de fármaco e engenharia de tecidos. Em uma segunda etapa, interações entre proteína e copolímero sintético a base de NIPAM e MPC foram avaliadas em solução aquosa.

2. Objetivos específicos

- Formar filmes de gelatina e caseína (na ausência e presença do plastificante sorbitol ou do agente reticulante EDC);
- Determinar a massa molar média da gelatina por viscosidade intrínseca;
- Quantificar a reticulação dos filmes formados pelas proteínas;
- Avaliar o grau de intumescimento, solubilidade e ângulo de contato dos filmes de gelatina/caseína reticulados;
- Avaliar a absorção e a permeabilidade ao vapor de água dos filmes;
- Analisar a morfologia dos filmes através de microscopia eletrônica de varredura;
- Determinar a temperatura de transição vítrea dos filmes a partir da análise termomecânica;
- Determinar a distância entre os agregados de proteínas nos filmes através de espalhamento de raios X a baixos ângulos;
- Avaliar as propriedades mecânicas dos filmes;
- Investigar o efeito do plastificante e do reticulante na estabilidade térmica dos filmes de gelatina/caseína através de análise termogravimétrica sob atmosfera de nitrogênio ou de ar;
- Avaliar os parâmetros de textura e os indicadores bioquímicos de amadurecimento de maçãs revestidas por coberturas de gelatina/caseína na presença ou ausência de aditivos;
- Estudar a liberação do fármaco modelo nos filmes reticulados;
- Avaliar a adesão celular aos filmes reticulados.
- Determinar o raio hidrodinâmico das proteínas puras e de misturas através do espalhamento de luz dinâmico;

- Avaliar a influência da temperatura e da concentração das soluções nos tamanhos das partículas de copolímeros termossensíveis formados por NIPAM e MPC através de medidas de espalhamento de luz dinâmico;
- Determinar a CMC dos copolímeros termossensíveis através de fluorescência e a temperatura de transição vítrea via calorimetria diferencial de varredura;
- Avaliar interações entre misturas de proteína e copolímero termossensível em função da temperatura e da concentração através de espalhamento de luz dinâmico;
- Analisar a morfologia dos copolímeros e através de microscopia eletrônica de transmissão.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Materiais

Neste estudo foram utilizados gelatina tipo B extraída da pele bovina (Bloom 225), cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) provenientes da Sigma-Aldrich, caseína da Acros Organics, sorbitol, cloreto de sódio, sulfato de sódio, carbonato de potássio, carbonato de sódio, éter etílico e ácido clorídrico da Nuclear e hidróxido de sódio da Merck.

O ácido cítrico, ácido ascórbico e a p-hidroxiaetanilida foram adquiridos no mercado local. As células de camundongo L929 (linhagem de fibroblastos) foram fornecidas pela American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, EUA) enquanto o meio de cultura celular Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) e o corante May-Grünwald/Giemsa foram obtidos da Sigma.

Os polímeros PNIPAM₈₁-PMPC₂₀₀-PNIPAM₈₁ (C1), PNIPAM₈₉-PMPC₂₅₀-PNIPAM₈₉ (C2), PNIPAM₉₀-PMPC₃₀₀-PNIPAM₉₀ (C3) e PNIPAM₇₉-PMPC₁₅₀-S-S-PMPC₁₅₀-PNIPAM₇₉ (C4) foram gentilmente cedidos pelo pesquisador Steven P. Armes, da Universidade de Sheffield, Inglaterra.

2. Determinação da massa molar da gelatina

A massa molar da gelatina foi determinada através de medidas de viscosidade intrínseca $[\eta]$. A viscosidade cinemática (ν) das soluções da proteína em diferentes concentrações foi medida, em triplicata, em um viscosímetro Cannon-Fenske acoplado a um leitor óptico Schott. A viscosidade dinâmica η foi calculada a partir da Equação 10, onde ρ é a densidade da solução polimérica diluída, que foi assumida ser igual a do solvente puro:

$$\eta = \rho \nu \quad (10)$$

Para obtenção de $[\eta]$, a viscosidade reduzida (η_{red}) foi calculada através das viscosidades relativa (η_{rel}) e específica (η_{sp}), através das seguintes equações:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_s} \quad \eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad \eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (11)$$

onde η_s é a viscosidade do solvente e c a concentração da solução polimérica (g mL^{-1}). A viscosidade intrínseca é definida pelo coeficiente linear de um gráfico de η_{red} versus c de acordo com a equação de Huggins, que descreve a viscosidade reduzida como função da concentração:

$$\eta_{red} = [\eta] + k_H [\eta]^2 c \quad (12)$$

onde k_H é a constante de Huggins, que representa as interações poliméricas e a qualidade do solvente.

O valor da massa molar média (M) foi estimado através da equação de Staundinger-Mark-Houwink (Eq. 13). Os valores das constantes específicas K ($1,66 \cdot 10^{-5}$) e a (0,885) para a gelatina foram obtidos da literatura:²¹¹

$$[\eta] = KM^a \quad (13)$$

3. Blendas formadas por gelatina/caseína

3.1. Preparação dos filmes

A solução de gelatina (3 % m/v) em água destilada e deionizada foi preparada através de agitação magnética a 55 °C por 40 min. A solução de caseína (3 % m/v) em água destilada e deionizada foi preparada através de agitação magnética a 95 °C por 270 min, sendo o pH ajustado para 9,0 com a adição de NaOH 4 mol L⁻¹. Após a solubilização e com o auxílio de uma proveta, foram preparadas misturas em diferentes proporções de gelatina/caseína (70/30, 50/50, 30/70), que permaneceram sob agitação magnética a 55 °C por 25 minutos. Após este tempo, as soluções foram agitadas a temperatura ambiente por 2 h. O plastificante sorbitol (20 %, m/m) foi adicionado, quando necessário. Para preparar os filmes reticulados, 40 mmol L⁻¹ de EDC foram adicionados sob agitação magnética de 1 min após as soluções estarem prontas.

Os filmes dos polímeros puros e das blendas foram preparados pelo método de evaporação do solvente em placas de poliestireno em uma capela de exaustão por cerca de 48 h. Após este tempo, os filmes foram secos à vácuo e estocados em dessecador até a realização das análises.

3.2. Determinação do grau de reticulação nos filmes

A quantificação da reticulação dos filmes foi realizada através da reação do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) com grupos amino primários das proteínas, de acordo com o método descrito por Bubnis e Ofner²¹² com pequenas modificações. Foram pesados 5,5 mg de amostra em um tubo de ensaio e adicionados 0,5 mL de solução de NaHCO₃ 4 %, 0,5 mL de solução 0,5 % de TNBS e aquecidos à 40 °C por 4 h. Após este tempo, 1,5 mL de HCl 6 N foi adicionado e a mistura autoclavada por 1 h a 120 °C e 0,10 – 0,12 MPa. O produto hidrolisado foi diluído em água destilada e deionizada (2,5 mL) e extraído com 10 mL de éter etílico para remover o excesso de TNBS. Uma alíquota de 2,5 mL da fase aquosa foi aquecida por 30 minutos em um banho quente para remover o éter residual, deixada resfriar a temperatura ambiente e novamente diluída com 7,5 mL de água destilada e deionizada. A absorbância da solução foi medida a 346 nm usando um espectrômetro Perkin Elmer Lambda 11/Bio. O branco foi preparado como descrito acima, mas adicionando-se HCl 6 N antes da adição de TNBS para inibir a reação deste com grupos amino. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram obtidos convertendo-se os valores de absorbância para número de grupos amino presentes por grama de amostra através da Equação 14:

$$n^{\circ} \text{ moles de grupos amino/g amostra} = \frac{2(\text{absorbância}) \cdot 0,0010L}{(1,46 \cdot 10^{-4} \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \cdot b \cdot x} \quad (14)$$

Nesta equação $1,46 \cdot 10^{-4} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ corresponde a absorvidade molar do TNBS-lisina, b é o caminho ótico (em cm) e x é a massa da amostra (em gramas). A porcentagem de reticulação (% R) foi calculada em relação ao número de grupos ϵ -amino perdidos com a reticulação, conforme Equação 15, onde amino(N) e amino(R) são o número de ϵ -grupos amino livres nos filmes não reticulados e reticulados respectivamente.

$$\%R = \frac{(a \min o(N) - a \min o(R)) \cdot 100}{a \min o(N)} \quad (15)$$

3.3. Ensaio de intumescimento e de solubilidade

Amostras dos filmes (2 cm x 2 cm) reticulados foram previamente secos em estufa à vácuo até massa constante. Os filmes foram imersos em 30 mL de água destilada e deionizada e, após leve secagem da superfície com um papel absorvente para retirar o excesso de água, foram

pesados para avaliar o intumescimento. O máximo tempo de imersão foi de 66 h. A percentagem de intumescimento do filme ($\%I$) foi determinada de acordo com a Equação 16:

$$\%I = \frac{(W_t - W_o) \times 100}{W_o} \quad (16)$$

onde W_t é a massa do filme após intumescimento no tempo t e W_o é a massa da amostra seca. A análise foi realizada em triplicata.

Em relação à solubilidade, os filmes foram secos em estufa à vácuo até massa constante após 24 h de imersão em água. A Equação 16 foi utilizada para determinar a percentagem mássica do filme solubilizado. A análise foi realizada em triplicata.

3.4. Determinação do ângulo de contato em água

Esta técnica foi utilizada para avaliar a hidrofilicidade da superfície dos filmes de gelatina/caseína reticulados. Os ângulos de contato foram medidos após deposição de gotas de água destilada e deionizada sobre os filmes em estudo. Foi utilizado um goniômetro Data Physics com software Image Tool e as imagens foram capturadas com uma câmera fotográfica de alta resolução. Foram realizadas cinco medidas para cada amostra.

3.5. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada a 23 °C e umidade relativa de 75 % (solução supersaturada de NaCl) por meio de método gravimétrico, baseado na metodologia ASTM E-96-00 (*Standard test methods for water vapor transmission of materials*). Sílica-gel seca foi colocada no interior de uma cápsula de teflon e isolada do ambiente de condicionamento pelo filme cuja PVA se deseja conhecer. Os filmes foram previamente secos à vácuo por 5 dias. Todo o sistema foi pesado em determinados intervalos de tempo durante 3 dias. As medidas foram realizadas em triplicata.

3.6. Absorção dos vapores de água

Filmes nas dimensões de 2 cm x 2 cm foram submetidos a um ambiente de umidade relativa de 43 % (solução supersaturada de K_2CO_3), 75 % (solução supersaturada de NaCl) e 94 % (solução supersaturada de Na_2SO_4). As amostras foram previamente secas em estufa à vácuo

até massa constante, pesadas e acondicionadas em um dessecador na umidade desejada. Em tempos determinados as amostras foram pesadas e o conteúdo de água absorvida foi determinado, em porcentagem (%W), e acordo com a Equação 17:

$$\%W = \frac{(W_t - W_o) \times 100}{W_o} \quad (17)$$

onde W_t é a massa da amostra submetida à umidade no tempo t e W_o é a massa da amostra seca. A análise foi realizada em triplicata.

3.7. Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos filmes de gelatina/caseína foi observada em um microscópio eletrônico de varredura Philips XL30. As superfícies superiores e as fraturas (em N_2 líquido) foram fixadas em suporte metálico e metalizadas com uma fina camada de ouro.

3.8. Análise termomecânica

A miscibilidade entre os polímeros foi avaliada através da determinação da temperatura de transição vítrea (T_g). Para isso, medidas de análise termomecânica (TMA) foram realizadas em um equipamento da Shimadzu TMA-50, com fluxo de nitrogênio de 50 mL min^{-1} e dimensões do filme de $10 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$. A espessura média dos filmes foi de $0,1 \text{ mm}$. Uma primeira corrida (taxa de aquecimento de $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $120 \text{ }^\circ\text{C}$ permanecendo 10 minutos nesta temperatura) foi realizada para retirar a água adsorvida ao filme. Após resfriamento até cerca de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, uma segunda corrida foi realizada (taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $250 \text{ }^\circ\text{C}$) para a determinação da T_g como o coeficiente linear de expansão térmica (α). A T_g corresponde a temperatura na qual a amostra exibe uma variação significativa no valor de α (Eq. 18), onde L_o é o comprimento original da amostra e $\frac{dL}{dT}$ é a inclinação da curva de TMA.

$$\alpha = \left(\frac{dL}{dT} \right) \left(\frac{1}{L_o} \right) \quad (18)$$

3.9. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos

As medidas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) foram realizadas no European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) em Grenoble (França). Filmes de gelatina/caseína 6 % (m/v) foram analisados em temperatura ambiente. A energia incidente foi de 16 keV e as distâncias das amostras ao detector foram de 17 e 129 cm. As medidas de SAXS foram representadas como intensidade de espalhamento (I) em função da magnitude do vetor de espalhamento q (Eq. 19):

$$q = \frac{4\pi \sin(\theta)}{\lambda} \quad (19)$$

onde 2θ é o ângulo entre o feixe incidente de raios-X e o detector medidor da intensidade de espalhamento e λ é o comprimento de onda dos raios-X. A intensidade de espalhamento das amostras foi subtraída do branco (janela vazia). A distância média entre os agregados de proteína foi calculada de acordo com a Equação de Bragg²¹³ (Eq. 20), onde q_{\max} é o valor do vetor espalhamento “ q ” para o máximo do pico de espalhamento:

$$d = \frac{2\pi}{q_{\max}} \quad (20)$$

3.10. Análise mecânica

Os ensaios de tensão-deformação foram conduzidos em um equipamento Emic DL 2000, com célula de carga TR21 com base na norma ASTM D882-95a (*Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*), operando à velocidade de 10 mm min⁻¹ à temperatura ambiente. As dimensões de cada amostra foram de 2,3 x 9 cm. A espessura do filme foi medida com um micrômetro, pela média de quatro determinações tomadas aleatoriamente em cada corpo de prova. A separação inicial das garras foi de 5 cm. Um computador foi utilizado para gravar as curvas de tensão-deformação de 8-10 corpos de prova. As amostras foram previamente mantidas em um dessecador à umidade relativa de 43 % (solução supersaturada de K₂CO₃), 75 % (solução supersaturada de NaCl) e 94 % (solução supersaturada de Na₂SO₄).

3.11. Análise termogravimétrica

A degradação térmica das amostras foi realizada em um analisador termogravimétrico Shimadzu (TGA 50), com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera de nitrogênio ou ar sintético (fluxo de $50\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$).

4. Aplicações dos filmes de gelatina e caseína

4.1. Coberturas comestíveis para maçãs

As maçãs Fuji foram descascadas, fatiadas e a metade das amostras foram mergulhadas por 2 min em solução 0,5 % ácido cítrico (AC) + 0,5 % ácido ascórbico (AA). Após secagem destas, todas as amostras (inclusive as que não foram mergulhadas na solução anterior) foram imersas em uma solução polimérica por 30 s. As soluções poliméricas (3 %) nas quais as maçãs foram mergulhadas eram formadas por gelatina, gelatina/caseína 50/50 e caseína, todas na presença ou ausência de agente plastificante (sorbitol) ou reticulante (EDC). As soluções poliméricas foram preparadas como descrito no item 3.1. As maçãs minimamente processadas (MP) foram mantidas na geladeira após secagem. As medidas descritas a seguir foram realizadas no segundo e no nono dia após as maçãs terem passado por este processo.

4.1.1. Determinação dos sólidos solúveis totais

A leitura do teor de sólidos solúveis totais (SST) da alíquota do extrato aquoso das maçãs MP foi feita em refratômetro Tropenmodell I (Carl Zeiss – Jena) e os resultados foram expressos em $^{\circ}\text{Brix}$.

4.1.2. Determinação do pH

Cerca de 5 g de maçãs foram batidas no liquidificador com 50 mL de água destilada e deionizada e o pH da solução foi verificado em um pHmetro Phtek modelo PHS-3B. As medidas foram realizadas em triplicata.²¹⁴

4.1.3. Determinação dos parâmetros de textura

Os parâmetros de textura (firmeza e fraturabilidade) foram avaliados pelo método instrumental de perfuração/penetração utilizando o aparelho Stevens LFRA Texture Analyser. O método consiste em fazer um cone (TA17 ângulo 30°) penetrar na amostra (10 mm) e em seguida ser retirado a uma velocidade constante de 1 mm.s⁻¹. Estes parâmetros foram calculados a partir de uma curva (carga *versus* tempo, Figura 6) gerada pelo aparelho. Para cada amostra foram analisados 9 corpos de prova.

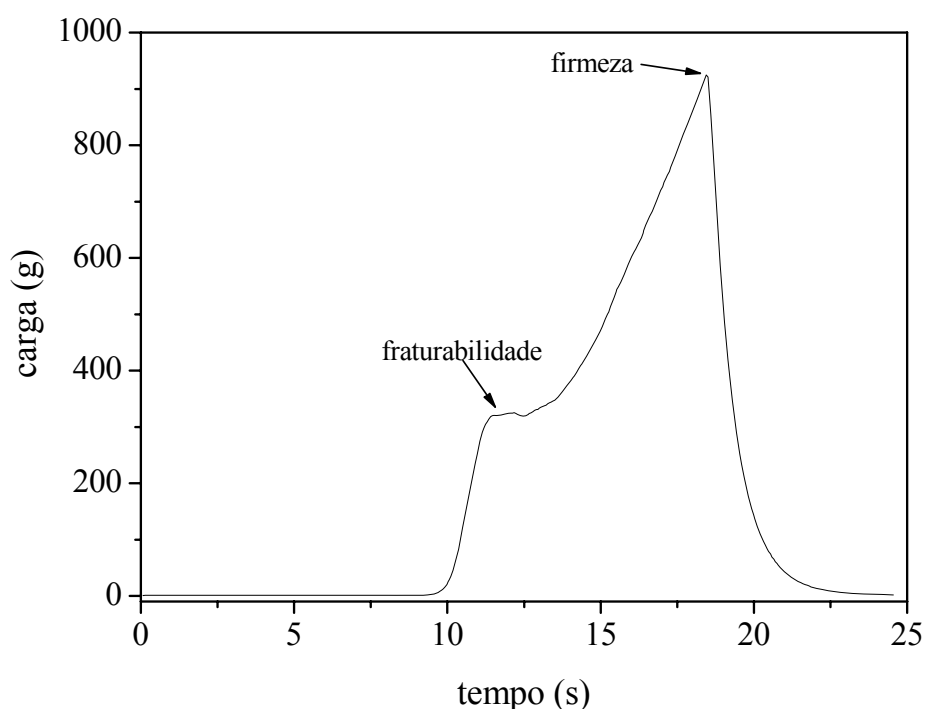


Figura 7. Exemplo de curva carga-tempo gerada pelo analisador de textura.

4.2. Liberação controlada de fármacos

4.2.1. Liberação do fármaco

Uma curva de calibração foi obtida para a p-hidroxiacetanilida através de medidas de absorbância de soluções deste fármaco (0,00125 mg mL⁻¹ – 0,02 mg mL⁻¹) a 244 nm em um espectrofotômetro Perkin Elmer (Lambda 11/Bio). O ensaio de permeação do fármaco modelo através das membranas poliméricas foi realizado com o auxílio de uma célula de difusão horizontal (Figura 7). Cada compartimento tem volume de cerca de 7 mL e a área do filme sujeita à permeação é de 6,8 cm². Os filmes reticulados permaneceram durante 1 h em solução

tamponada pH 7,4 a 37 °C e na sequência foram fixados entre os compartimentos da célula. O lado doador foi preenchido por uma solução saturada de fármaco (20,4 mg mL⁻¹) em tampão fosfato e o lado receptor apenas pelo tampão fosfato. O sistema foi agitado em um banho termostatzado e alíquotas de 0,2 mL foram retiradas periodicamente do lado receptor, diluída a 25 mL e analisadas no espectrômetro em 244 nm. Após cada análise, o volume total do lado receptor foi substituído por novo tampão fosfato para evitar a condição *sink*. As medidas foram realizadas em triplicata.

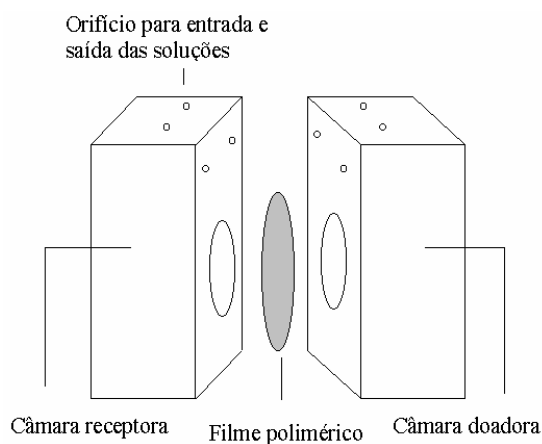


Figura 8. Célula de difusão utilizada para o estudo de liberação do fármaco.

4.3. Engenharia de tecidos

4.3.1. Preparo da cultura celular

As células de camundongo em meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) foram descongeladas em banho-maria a 37 °C sob agitação. Para o cultivo celular, o conteúdo do tubo criogênico foi transferido para um tubo de ensaio contendo o meio de cultura DMEM, que é composto por 10 % (v/v) de soro fetal bovino, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina, 100 UI mL⁻¹ de penicilina e 2 mmol L⁻¹ de glutamina. Após centrifugação por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e o precipitado levado para garrafas de cultura. Neste momento foi acrescentada a solução DMEM. A suspensão celular foi mantida em incubadora a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO₂. Após 2-3 dias as células foram destacadas dos frascos com tripsina 0,25 % (m/v) e ácido etilenodiamino tetracético 1 mmol L⁻¹ e colocadas em um novo frasco. Uma amostra controle também foi preparada com a finalidade de determinar a validade do ensaio. Por ser biologicamente não reativa foi utilizada uma laminula de vidro como controle negativo.

4.3.2. Teste de citotoxicidade

Uma placa de 24 poços foi levada à capela de fluxo laminar e lavada com tampão fosfato (PBS). A solução foi aspirada com o auxílio de uma pipeta e o processo de lavagem foi realizado em triplicata. Os filmes de gelatina/caseína reticulados foram cortados em discos circulares, lavados com etanol 70 % (v/v), colocados sobre luz ultravioleta para esterilização e lavados diversas vezes com PBS. Na sequência os filmes foram acomodados nos poços, colocando-se sobre eles anel de vidro para evitar que flutuem. As células foram destacadas dos frascos, contadas em um hemacitômetro e colocadas sobre as amostras em uma quantidade de 5×10^4 células/poço. A medida foi realizada em duplicata para os filmes e para o controle negativo. As placas foram levadas para incubação em estufa a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO₂ durante 24 h. Após este período as amostras foram observadas em microscópio óptico acoplado a uma câmera fotográfica e em microscópio eletrônico de varredura, para avaliar mudanças na morfologia geral, vacuolização, destacamento e lise celular. Para melhor visualização das células sobre os filmes foi utilizado o corante May-Grünwald/Giemsa, formado por eosinato de azul-de-metileno (May-Grünwald: 0,2 g may-grünwald diluído em 100 mL de álcool metílico) e azul-eosina (Giemsa: 0,3 g giemsa em pó, 25 mL de glicerina diluídos em 25 mL de álcool metílico).

5. Polímeros termossensíveis: estudos em solução e associação com as proteínas

5.1. Calorimetria diferencial de varredura

As análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizadas em um equipamento DSC-50, da Shimadzu, sob atmosfera inerte (N₂, fluxo 50 cm³ min⁻¹). Cerca de 7 - 11 mg de copolímero formado por NIPAM/MPC foram colocados em recipiente adequado de alumínio e aquecido a 20 °C min⁻¹ até 200 °C, permanecendo 5 min nesta temperatura. Em seguida as amostras foram submetidas a um choque térmico (com N₂ líquido) e a dois aquecimentos realizados na faixa de 0 – 200 °C a 10 °C min⁻¹. O resfriamento da amostra entre estas varreduras foi realizado à temperatura ambiente.

O mesmo equipamento foi utilizado para determinar a capacidade calorífica à pressão constante (C_p) de soluções dos copolímeros 7 % (m/v). Para isso, varreduras foram realizadas para o branco (recipiente vazio), para a alumina e para a amostra de polímero. Nos três casos, a programação utilizada consistiu em estabilizar a temperatura durante 10 min a 10 °C, aquecer até 120 °C na taxa de 2 °C min⁻¹ e manter nesta temperatura durante 5 min. A partir da diferença

entre as 3 curvas foi obtida a temperatura de transição através da intersecção da linha base e a porção linear do pico do termograma. A medida foi realizada em duplicata.

5.2. Fluorescência

Medidas de fluorescência do pireno foram realizadas em um espectrofluorímetro Hitach F-4500 acoplado a um banho termostatzado. As análises foram realizadas após a adição de alíquotas de 1 mg mL^{-1} de copolímero contendo pireno ($1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-3}$) a uma solução de pireno (2 mL , $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-3}$) dentro de uma célula de quartzo. O espectro de emissão da fluorescência (360 - 500 nm) foi realizado em λ_{ex} de 336 nm. O copolímero C1 foi avaliado a 20 e a 40 °C enquanto os demais (C2, C3 e C4) foram avaliados apenas a 40 °C.

5.3. Espalhamento de luz dinâmico

Os copolímeros C1, C2, C3 e C4 foram solubilizados em água destilada à temperatura ambiente. As soluções de gelatina e caseína foram preparadas de acordo com o descrito no item 3.1. Em todos os casos, soluções $8,00$ e $2,50 \text{ mg mL}^{-1}$ foram preparadas e diluídas após filtração. Para soluções formadas pelos copolímeros foram utilizados filtros com porosidade de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ enquanto para as proteínas a porosidade dos filtros foi de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$. Soluções de gelatina/copolímero foram misturadas e mantidas a 20 ou 40 °C durante 4 e 2 h, respectivamente, antes das análises. Em relação às misturas de caseína/copolímero, os tempos foram de 3 e 1,5 h, respectivamente. Para misturas entre as proteínas, o tempo foi de 4 h e as análises realizadas apenas a 20 °C.

Medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram realizadas para as soluções de gelatina, caseína e copolímeros, para misturas de proteína/copolímero e proteína/proteína utilizando um goniômetro ALV E5000 real time correlator (ALV Langen) O comprimento de onda da luz foi de 488 nm. As medidas foram realizadas em diferentes ângulos (20 - 150°) e temperaturas (10 - 50 °C). Foram utilizadas alíquotas de 1 mL de solução em células de vidro e a aquisição dos dados foi realizado em 30 s para cada ângulo. Tolueno foi utilizado como padrão de calibração. A distribuição do tamanho das partículas foi obtida pelo programa CONTIN.

O raio hidrodinâmico (R_H) foi calculado a partir da relação de Stokes-Einstein (Eq. 21), onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura da amostra e η é a viscosidade do

meio.²¹⁵ O coeficiente de difusão D é o coeficiente angular de um gráfico da frequência de relaxação Γ ($\Gamma = \tau^{-1}$) em função de q^2 (Eq. 22):

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_o} \quad (21)$$

$$\Gamma = Dq^2 \quad (22)$$

Intensidades de luz espalhada a 90° foram medidas para soluções de copolímero nas concentrações de 0,25 e 1,30 mg mL⁻¹. O tempo de permanência da solução em cada temperatura selecionada para a análise foi diferente: na faixa de 20 – 33 °C a amostra permaneceu 20 min na temperatura selecionada antes da medida ser realizada, na faixa de 33 – 42 °C o tempo foi de 50 min e na faixa de 42 – 50 °C foi de 30 min.

Medidas de intensidades de luz espalhada a 90° também foram realizadas para a solução do copolímero C2 (0,25 mg mL⁻¹) em diversas temperaturas na faixa de 20 - 50 °C, com intervalo de 25 min entre as análises. Em outro experimento uma solução aquosa do copolímero C2 (0,25 mg mL⁻¹) foi analisada a 90° nas temperaturas de 35, 40 ou 50 °C. Uma das temperaturas mencionadas foi estabilizada e, após colocar a cubeta contendo solução no aparelho, medidas de espalhamento de luz dinâmico foram imediatamente conduzidas durante um período de 2 h. Diferentes cubetas foram utilizadas para cada temperatura com conteúdo proveniente de uma mesma solução preparada.

5.4. Microscopia eletrônica de transmissão

O tamanho e a morfologia dos copolímeros foram observados por microscopia eletrônica de transmissão (MET - Philips CM200, Eindhoven) operando a 80 kV. Para preparar as amostras, 2μL de uma solução polimérica 2,50 mg mL⁻¹ foi espalhado sobre uma grade de carbono e o solvente evaporado sob atmosfera de vapor de OsO₄ (utilizado para promover contraste à imagem) a 20 ou 40 °C. As grades com amostras a 20 °C secaram à temperatura ambiente. Nos estudos realizados a 40 °C, as soluções foram previamente mantidas nesta temperatura durante 1 h e em seguida gotejada na grade, secando também a 40 °C. Os tamanhos foram obtidos a partir da média de 15 a 100 nanopartículas (dependendo do sistema) tomadas de 5 micrografias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Determinação da massa molar da gelatina

A massa molar média da gelatina foi determinada através de medidas de viscosidade. O valor da viscosidade intrínseca ($0,441 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) foi obtido pelo coeficiente linear de um gráfico de viscosidade reduzida *versus* concentração. A massa molar média foi estimada de acordo com a equação de Staundinger-Mark-Houwink (Eq. 13) sendo os valores de K e a para o gelatina iguais a $1,66 \cdot 10^{-5}$ e $0,885$ respectivamente.²¹¹ O valor obtido foi da ordem de 10^5 g mol^{-1} concordando com os resultados descritos na literatura para a gelatina do Tipo B, que estão na faixa de 1 a $5 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$.²¹¹

2. Caracterização dos filmes de gelatina/caseína: efeito da adição de agente plastificante e reticulante

2.1. Determinação do grau de reticulação dos filmes

O grau de reticulação dos filmes formados por gelatina e caseína (Tabela 3) foi determinado pela diferença entre o número de grupos amino livres nos filmes não reticulados e nos reticulados.²¹² Esta diferença foi baseada na formação de ligações amida através da reação entre o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) e resíduos de lisina, hidroxilisina e ácidos aspártico e glutâmico das proteínas. De acordo com a literatura,¹¹ a gelatina apresenta aproximadamente 33 grupos ϵ -amino e cerca de 120 grupos ácidos carboxílicos em uma cadeia composta por 1000 resíduos de aminoácidos. Desta forma, o agente reticulante apresenta um elevado potencial para reticulação desta proteína, embora o subproduto da reação (derivado de uréia) apresente solubilidade em água.

O filme de gelatina apresentou o maior grau de reticulação (90,6 %) seguido pela blenda 30/70 (85,4 %). Este resultado sugeriu que houve melhor distribuição de ambas as proteínas na blenda, afetando a estrutura interna das mesmas na mistura e induzindo a um processo de reticulação excepcionalmente mais efetivo. Resultado similar foi observado em filmes formados por gelatina e poli(acrilamida-co-ácido acrílico).²¹⁶ Por outro lado, o filme de caseína apresentou 69,6 % de reticulação, similar aos 74,8 e 71,8 % obtidos para as blendas formadas por gelatina/caseína nas proporções 70/30 e 50/50, respectivamente. A presença de caseína nos filmes diminuiu a percentagem de reticulação devido à menor disponibilidade dos grupos ϵ -

amino da lisina e hidroxilisina e dos grupos ácido aspártico e glutâmico. Estes grupos representam cerca de 23 e 25 % das frações α_{S1} e α_{S2} da caseína, que são as mais hidrofílicas, sugerindo que o grau de reticulação reflete, em parte, as diferenças de estrutura entre ambas as proteínas.

Tabela 3. Grau de reticulação dos filmes de gelatina/caseína.

Gelatina/caseína (% m/m)	Grau de reticulação (%)
100/0	90,6 \pm 2,2
70/30	74,8 \pm 2,2
50/50	71,8 \pm 2,1
30/70	85,4 \pm 0,3
0/100	69,6 \pm 3,0

O método de reticulação empregado neste trabalho foi mais eficiente que o utilizado por Choi e colaboradores,²⁰⁷ onde esponjas formadas por gelatina/alginato foram imersas em uma mistura de acetona/água 90 % (v/v) contendo diferentes concentrações de EDC (0,1 e 0,5 %, m/m). O grau de reticulação obtido para as esponjas foi inferior a 32 %.

2.2. Solubilidade, intumescimento e medidas de ângulo de contato

Medidas de solubilidade, intumescimento e de ângulo de contato foram realizadas nos filmes de gelatina/caseína reticulados e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4. Os demais filmes não foram analisados pelo fato de apresentarem rápida solubilização em meio aquoso. O grau de intumescimento dos filmes permaneceu praticamente constante no intervalo de 5 a 66 h de análise, desta forma estão apresentados na Tabela 4 apenas os valores referentes à medida realizada após 24 h de imersão. Após este tempo os filmes apresentaram perda de massa de aproximadamente 21 %, sugerindo que o processo de reticulação foi eficiente. Resultados similares foram obtidos para o sistema formado pela gelatina reticulada com TGase, onde os filmes não reticulados foram totalmente solúveis em água a 25 °C enquanto os reticulados (0,30 mg mL⁻¹ de TGase) apresentaram solubilidade de 27 %. Na mesma temperatura e em pH 6, a solubilidade dos filmes de gelatina/quitosana diminuiu de 65% (filmes não modificados) para 26% e 21% após reticulação com TGase e EDC, respectivamente.¹²¹

Tabela 4. Solubilidade, intumescimento e ângulo de contato dos filmes reticulados de gelatina/caseína

Gelatina/caseína (% m/m)	Solubilidade (%)	Intumescimento (%)	Ângulo de contato (°)
100/0	21,7 ± 0,2	87,2 ± 8,3	94,7 ± 4,5
70/30	21,1 ± 3,3	55,9 ± 11,8	80,7 ± 1,9
50/50	21,2 ± 5,7	41,8 ± 6,1	86,0 ± 0,8
30/70	22,5 ± 0,1	41,3 ± 7,6	92,8 ± 1,7
0/100	21,9 ± 2,3	32,5 ± 4,2	82,8 ± 1,2

O grau de intumescimento dos filmes reticulados formados por gelatina/caseína diminuiu com a redução do conteúdo de gelatina. Como observado na Tabela 4, os filmes de gelatina e de caseína apresentaram grau de intumescimento de 87,2 % e 32,5 %, respectivamente, enquanto as blendas 70/30, 50/50 e 30/70 intumesceram, respectivamente, 55,9, 41,8 e 41,3 %. O filme de caseína apresentou o menor grau de reticulação e de intumescimento e foi observado que a blenda com 50 % de cada componente apresentou resultados mais próximos aos obtidos para a caseína pura, sugerindo que este polímero afetou a estrutura da gelatina. O elevado grau de intumescimento e de reticulação apresentado pelo filme de gelatina indicou que o tratamento com EDC favoreceu a exposição dos grupos hidrofílicos livres. Este perfil parece razoável se considerarmos que o EDC reagiu com os grupos amina da gelatina e não com os grupos hidroxila que estão distribuídos ao longo da cadeia.²¹⁷

A interação entre uma superfície e um determinado líquido pode ser estudada através de medidas de ângulo de contato. Este é definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido e um plano contendo a superfície onde o líquido está depositado. As imagens das medidas de ângulo de contato realizadas para os filmes reticulados de gelatina, caseína e para a blenda 50/50 são apresentadas na Figura 9.

Os filmes reticulados formados pela gelatina e pela blenda contendo 30 % desta proteína apresentaram valores de ângulo de contato semelhantes (~ 93°) e mais elevados que os demais (80 – 86°), mostrando que ambos apresentam um grau de reticulação similar e maior hidrofobicidade, discordando dos resultados observados pelas medidas de intumescimento. Este efeito pode estar relacionado à presença do derivado de uréia (subproduto da reação de reticulação) na superfície do filme, alterando as propriedades dos mesmos.

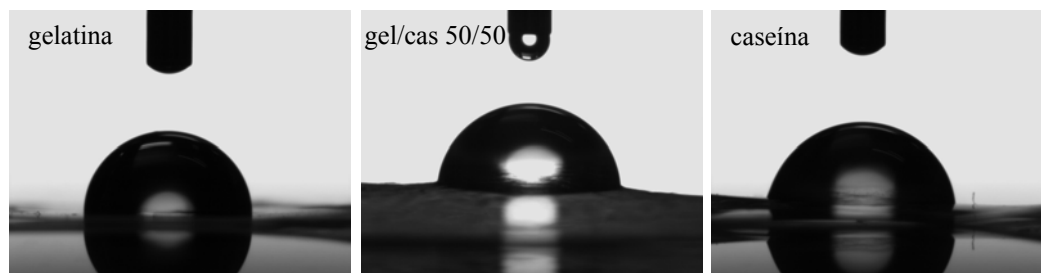


Figura 9. Imagens de gotas de água sobre a superfície dos filmes reticulados.

2.3. Permeabilidade e absorção de vapores de água

Os valores de permeabilidade ao vapor de água (Tabela 5) foram determinados para os filmes formados pelas proteínas puras e pela blenda contendo 50 % de cada componente na presença ou não de aditivos. De acordo com Chen,²¹⁸ uma cadeia polimérica simples e linear, como apresentado por vários polímeros sintéticos, pode apresentar um firme empacotamento enquanto moléculas com cadeias volumosas, como as proteínas, apresentam menor empacotamento e, conseqüentemente, maior permeabilidade.

Os filmes de gelatina e a blenda contendo 50 % de cada polímero apresentaram valores de PVA ($1,41$ e $0,99 \times 10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, respectivamente) superiores aos obtidos para os filmes plastificados (faixa de $0,54 - 0,61 \times 10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$). A medida não foi realizada para o filme de caseína puro pelo fato deste ser muito quebradiço. De acordo com a literatura,²¹⁹ a adição de sorbitol aumenta a PVA do biopolímero em relação ao puro devido a capacidade de absorção de água pelo agente plastificante, aumentando, conseqüentemente, o coeficiente de difusão de vapor de água pelo filme. Este resultado não foi observado para os filmes de gelatina/caseína contendo sorbitol devido, provavelmente, a pequena quantidade de plastificante não ter sido suficiente para aumentar a mobilidade molecular. Este fenômeno depende também das condições de armazenamento e é conhecido como efeito antiplastificante.²²⁰

Tabela 5. Permeabilidade aos vapores de água obtidos para os filmes de gelatina/caseína analisados na UR 75 %.

Gel/cas (% m/m)	PVA ($\times 10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$)		
	Puro	Sorbitol	EDC
100/0	$1,41 \pm 0,07$	$0,60 \pm 0,12$	$1,54 \pm 0,22$
50/50	$0,99 \pm 0,12$	$0,61 \pm 0,03$	$1,38 \pm 0,03$
0/100	-	$0,54 \pm 0,18$	$1,49 \pm 0,08$

Não foram observadas diferenças significativas nos valores de PVA ($1,38 - 1,54 \times 10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) para os três filmes reticulados. Estes valores foram inferiores aos obtidos por Rivero e colaboradores²²¹ para filmes de gelatina ($3,32 \times 10^{-10}$ e $5,16 \times 10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) com espessura de 210 e 410 μm , respectivamente. Piotrowska e colaboradores²²² mostraram que a PVA ($7,33 \times 10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) determinada para filmes não modificados de gelatina obtida de peixe não foi significativamente alterada pela reticulação com TGase ou EDC ($6,89$ e $6,61 \times 10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, respectivamente). Estes valores foram próximos aos obtidos para os filmes de gelatina/quitosana nas mesmas condições.¹²¹ Em outro estudo¹⁰⁶ foi obtido o valor de $14,05 \times 10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ para filmes de caseína/gelatina (75/25) reticulados com TGase.

A presença de agente reticulante aumentou a PVA dos filmes em relação aos demais sistemas provavelmente devido ao aumento da mobilidade das cadeias, resultando no aumento do coeficiente de difusão. Além de modificar o arranjo estrutural da matriz polimérica, a reticulação pode ter aumentado a quantidade de aminoácidos hidrofílicos na superfície do filme.

A Tabela 6 apresenta os valores de absorção dos vapores de água pelos filmes após 24 h de equilíbrio em ambiente com umidade relativa (UR) controlada (75 e 94 %). No geral foi observado em ambas as UR que a absorção dos vapores de água não apresentou variação significativa na faixa de 22 - 70 h, como mostram as Figuras 10 e 12. Como esperado, os filmes absorveram mais água na UR de 94 %. Medidas também foram realizadas na UR de 43 % (valores não apresentados) e os resultados mostraram que os filmes apresentaram absorção na faixa de 0 – 4 %.

Tabela 6. Absorção dos vapores de água pelos filmes de gelatina e caseína após 24 h de equilíbrio.

Gelatina/caseína (% m/m)	UR 75 %			UR 94 %		
	Puro	Sorbitol	EDC	Puro	Sorbitol	EDC
100/0	$6,5 \pm 1,3$	$24,6 \pm 2,4$	$9,8 \pm 1,2$	$36,7 \pm 0,6$	$42,0 \pm 2,5$	$53,9 \pm 3,6$
70/30	$7,0 \pm 0,3$	$11,8 \pm 1,5$	$9,4 \pm 1,4$	$36,8 \pm 0,2$	$56,6 \pm 2,5$	$56,6 \pm 3,2$
50/50	$9,3 \pm 2,2$	$11,3 \pm 0,1$	$12,4 \pm 0,8$	$44,2 \pm 2,4$	$59,0 \pm 3,2$	$59,7 \pm 1,9$
30/70	$11,2 \pm 2,7$	$12,1 \pm 1,2$	$38,8 \pm 0,2$	$46,2 \pm 2,5$	$65,1 \pm 4,0$	$65,1 \pm 1,2$
0/100	$17,0 \pm 1,3$	$11,2 \pm 1,6$	$21,5 \pm 0,8$	$53,1 \pm 2,1$	$62,0 \pm 2,3$	$61,8 \pm 4,2$

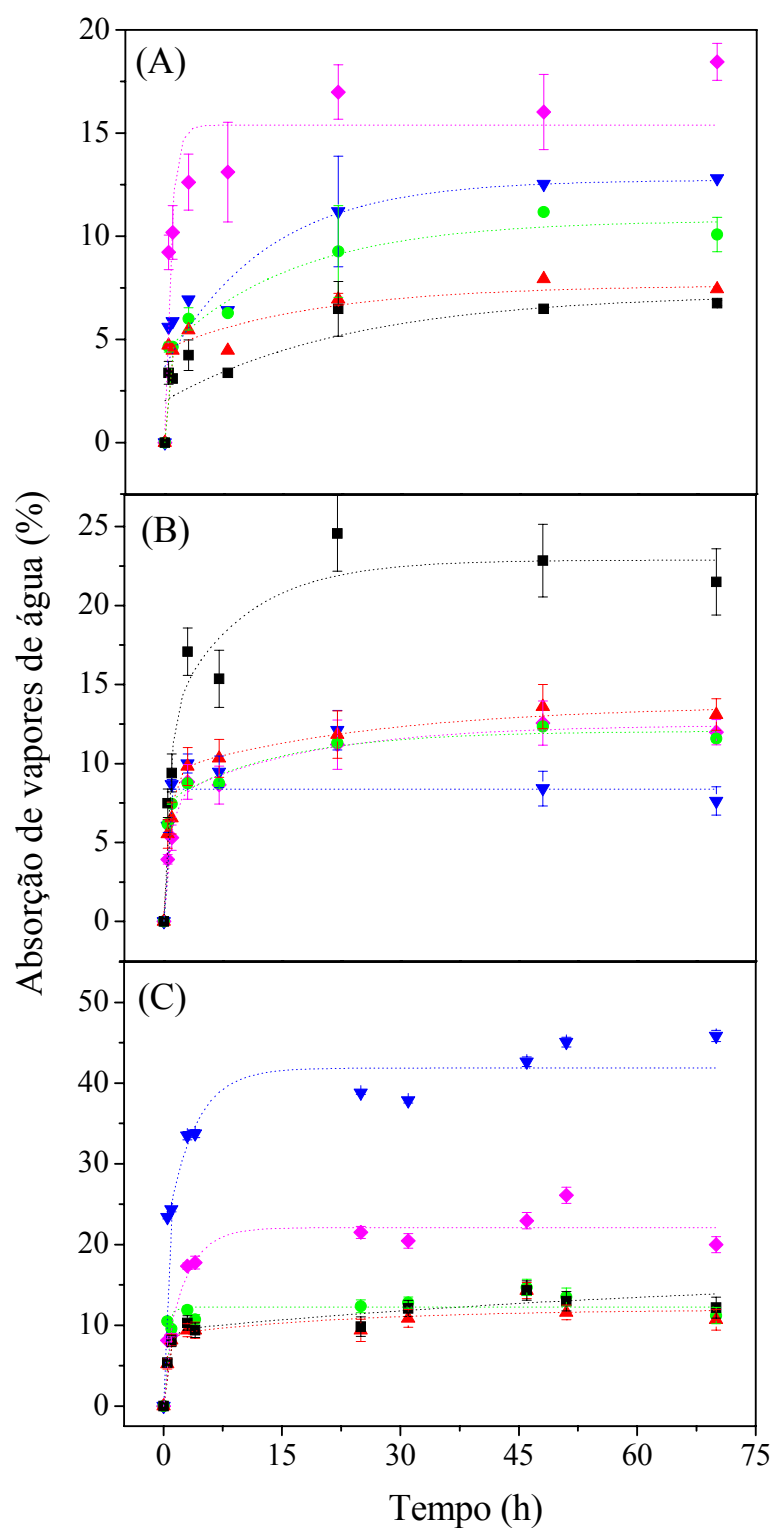


Figura 10. Absorção de vapores de água (UR 75 %) em função da composição dos filmes de gelatina/caseína: (■) 100/0, (▲) 70/30, (●) 50/50, (▼) 30/70 e (◆) 0/100, (A) sistema puro, (B) sistema plastificado e (C) sistema reticulado.

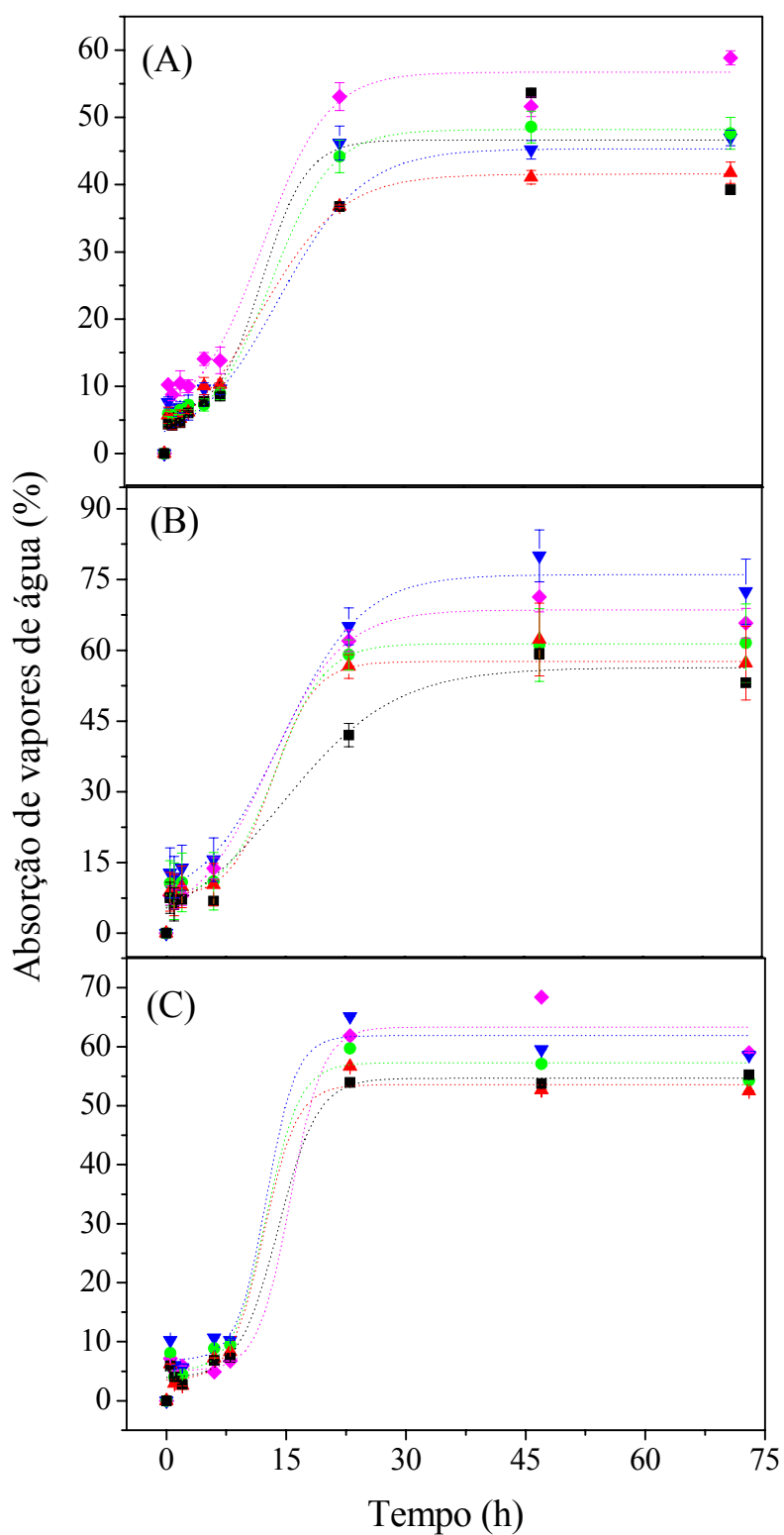


Figura 11. Absorção de vapores de água (UR 94 %) em função da composição dos filmes de gelatina/caseína: (■) 100/0, (▲) 70/30, (●) 50/50, (▼) 30/70 e (◆) 0/100, (A) sistema puro, (B) sistema plastificado e (C) sistema reticulado.

Sob UR de 75 %, o filme de gelatina e o de caseína apresentou aumento de massa de 6,5 % e 17,0 %, respectivamente, enquanto sob UR 94 % estes valores foram 36,7 e 53,1 %, respectivamente. Estes valores estão relacionados aos grupos amino livre e hidroxiprolina, entre outros, que apresentam natureza hidrofílica e à morfologia das proteínas. Por não apresentar característica fibrosa como a gelatina, a caseína apresentou maior absorção de vapores de água. Independentemente da UR, as blendas de gelatina e caseína sem aditivos apresentaram valores de absorção intermediários aos obtidos pelos polímeros puros.

No geral pode ser observado que filmes contendo sorbitol apresentaram maiores valores de absorção que os filmes sem aditivos, provavelmente devido a hidrofiliabilidade apresentada pelo agente plastificante. O filme de gelatina plastificado apresentou absorção de 24,6 e 42,0 % na UR de 75 e 94 %, respectivamente, enquanto filmes de caseína apresentaram 11,2 e 62,0 % de absorção, respectivamente. O filme de caseína absorveu mais vapor de água que o de gelatina devido, provavelmente, ao sorbitol ser mais eficiente no afastamento das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares nas cadeias de caseína. Sob UR de 75 %, as blendas plastificadas apresentaram aumento de massa entre 11,8 e 12,1 % e sob UR de 94 % os valores encontrados foram entre 56,6 e 65,1 %, intermediários aos obtidos para os polímeros puros.

O filme de gelatina reticulado apresentou absorção de água de 9,8 e 53,9 % nas UR de 75 e 94 %, respectivamente, enquanto a caseína apresentou 21,5 e 61,8 % de absorção, respectivamente. As blendas apresentaram aumento de absorção de água com a adição de caseína e os valores apresentados foram na faixa de 9,4 – 38,8 % para a UR 75 % e 56,6 – 65,1 % para UR de 94 %. Os filmes reticulados apresentaram, em alguns casos, valores de absorção de água intermediários aos obtidos para os sistemas sem aditivos ou plastificados. O aumento do conteúdo de gelatina na mistura diminuiu a capacidade de absorção, concordando com as medidas de ângulo de contato e com o grau de reticulação. A hidrofiliabilidade apresentada pelos filmes reticulados pode estar associada à presença de grupos aminos livres nas proteínas e ao derivado de uréia formado no processo de reticulação.

2.4. Estudos de miscibilidade: morfologia e análise termomecânica

A avaliação da morfologia dos filmes foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As Figuras 12 e 13 apresentam, respectivamente, as micrografias da superfície e da seção transversal dos filmes de gelatina, caseína e gelatina/caseína 50/50 na presença ou não de aditivos.

Os filmes do sistema puro e com plastificante apresentaram superfície lisa, compacta e com ausência de poros. Por outro lado, os filmes reticulados apresentaram pequenos cristais formados pela precipitação do excesso de EDC ou do derivado de uréia resultante do processo de reticulação.²¹²

O filme de caseína apresentou fratura de aparência lisa, provavelmente devido a sua baixa ordem molecular e pelo perfil anfifílico das micelas, que permitiram uma acomodação mais uniforme do material durante a formação do filme. Na presença de aditivos, os filmes de caseína apresentaram aspecto rugoso provavelmente devido a desnaturação da proteína, diminuindo seu caráter anfifílico e expondo as partes hidrofóbicas e, como consequência, dificultando a acomodação homogênea dos aditivos durante a formação do filme. Por outro lado, a gelatina é uma proteína fibrosa que apresenta mudança de morfologia na presença de EDC, provavelmente devido a perda da orientação fibrilar com a formação de estruturas em rede. As blends apresentaram uma estrutura mais frágil e presença de pequenos poros, sugerindo que a fração de caseína alterou significativamente o sistema.

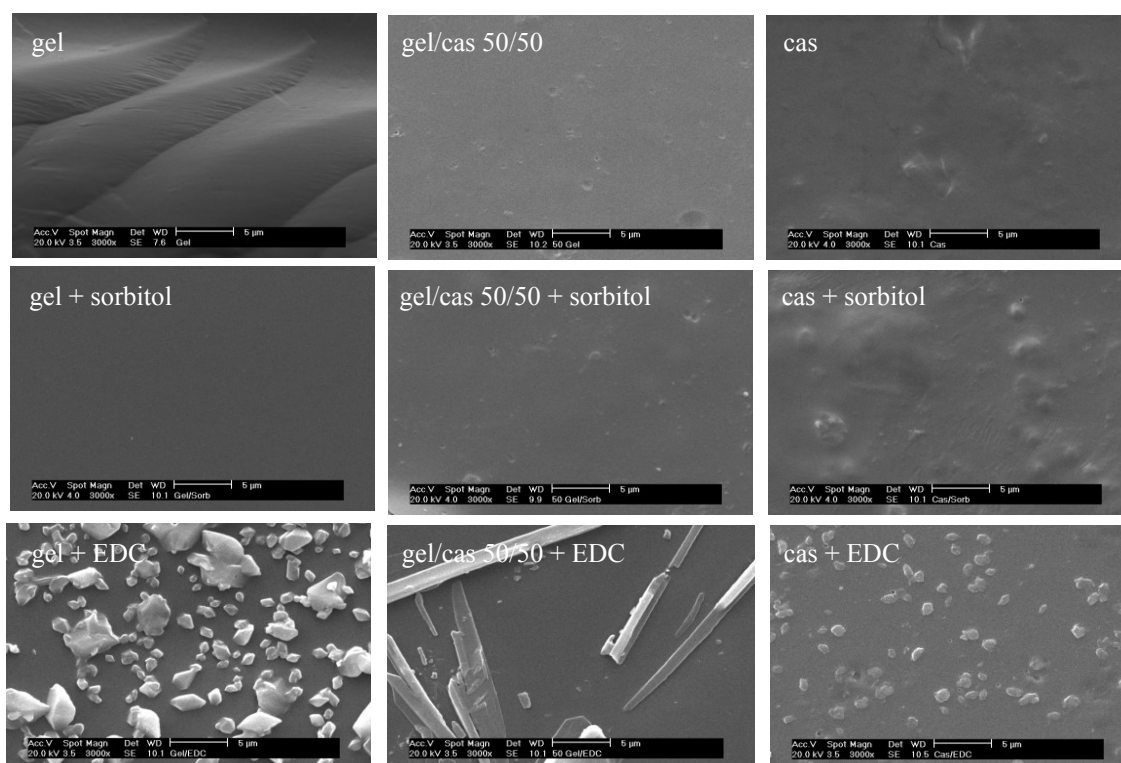


Figura 12. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes (aumento 300 x).

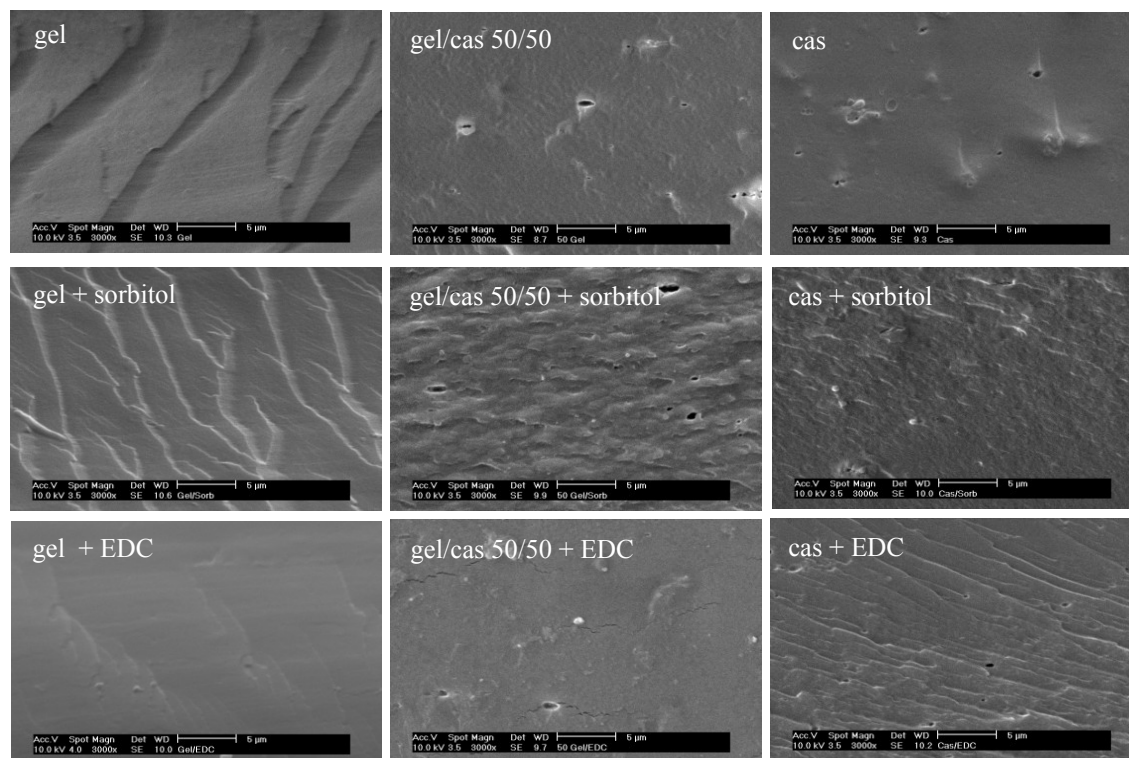


Figura 13. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da seção transversal dos filmes (aumento 3000 x).

A interação entre os polímeros também foi avaliada via análise termomecânica através da determinação da temperatura de transição vítrea (T_g). A T_g é a temperatura na qual o polímero passa do estado vítreo para um estado “fluido” sem ocorrência de uma mudança estrutural. Os resultados obtidos para os filmes puros e com aditivos estão apresentados na Tabela 7 e Figura 14.

O valor de T_g obtido para os filmes de gelatina e de caseína foram 214,6 e 207,3 °C, respectivamente. No caso da gelatina, o valor da T_g está de acordo a literatura (212 °C)²²³ enquanto a caseína apresentou um valor superior (144 °C).²²⁴ Os valores de T_g obtidos para as blendas gelatina/caseína 30/70, 50/50 e 70/30 foram 203, 208 e 210 °C, respectivamente, e aumentaram com a adição de gelatina. A presença de apenas uma T_g nas blendas sugeriu miscibilidade entre os componentes. A Equação de Fox (Eq. 1) foi utilizada para prever os valores de temperatura de transição vítrea das blendas e os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de Tg obtidos.

	Gelatina/caseína (% m/m)	Tg (°C) (DSC)	Tg (°C) (Eq. de Fox)	Efeito (°C) ^a
Puro	100/0	215 ± 3	215	-
	70/30	210 ± 2	212	2
	50/50	208 ± 1	211	3
	30/70	203 ± 2	209	6
	0/100	207 ± 2	207	-
Sorbitol	100/0	154 ± 4	154	-
	70/30	141 ± 3	155	14
	50/50	145 ± 1	156	10
	30/70	141 ± 4	156	15
	0/100	157 ± 3	157	-
EDC	100/0	145 ± 4	145	-
	70/30	140 ± 3	157	17
	50/50	144 ± 3	166	22
	30/70	143 ± 4	176	33
	0/100	193 ± 3	193	-

^a valor de Tg obtido pela diferença do valor encontrado pela Eq. de Fox e o experimental.

A adição de sorbitol diminuiu os valores de Tg dos filmes em relação ao sistema puro. Este resultado era esperado, pois a presença de plastificante aumenta o volume livre entre as cadeias poliméricas e, conseqüentemente, aumenta a mobilidade das mesmas e diminui as interações inter e intramoleculares. Os valores de Tg encontrados para os filmes plastificados formados por gelatina/caseína 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 e 0/100 foram 154, 141, 145, 141 e 157 °C, respectivamente. Estes valores são mais elevados que os obtidos pelas blendas formadas por gelatina/amido plastificados com água, glicerol ou açúcares.²²⁵ As blendas apresentaram apenas uma Tg, sugerindo miscibilidade entre os componentes.

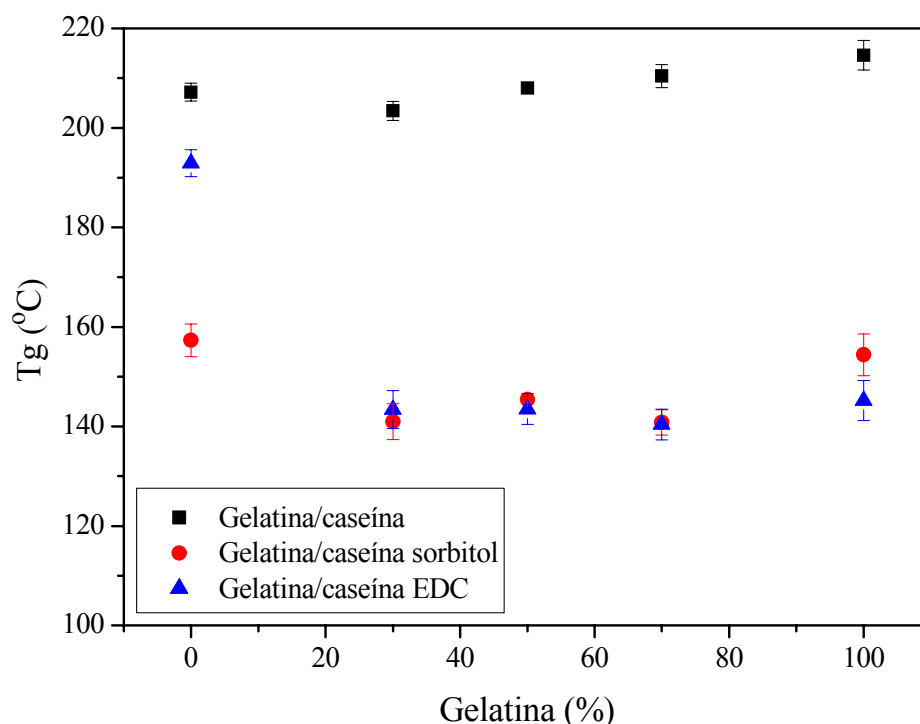


Figura 14. Temperatura de transição vítrea dos filmes.

Após reticulação com EDC, os valores de T_g obtidos para a gelatina e caseína diminuíram para 145 e 193 °C, respectivamente, em relação ao sistema puro. O maior efeito devido a presença do reticulante observado para o filme de gelatina está de acordo com o grau de reticulação (90,6 %). Como observado para os outros sistemas, somente uma T_g foi obtida para as misturas reticuladas, que foi similar ao apresentado pelo filme de gelatina reticulado (cerca de 142 °C), sugerindo que, neste caso, os principais fatores que afetaram a T_g foram a elevada percentagem de reticulação e de intumescimento do filme de gelatina. A redução da T_g nos filmes reticulados em relação ao sistema puro sugere que o EDC tenha provocado um efeito similar a de um agente plastificante. Este efeito pode ser associado a desnaturação das estruturas terciária e quaternária das proteínas, diminuindo a rigidez das cadeias poliméricas. Resultado similar foi observado por Arvanitoyannis e colaboradores em misturas de gelatina/amido.²²⁵

2.5. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos

Medidas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) podem ser utilizadas para determinar o tamanho das partículas ou a distância entre os agregados. O gráfico de Guinier, limitado a casos onde $q \cdot R_g < 1,3$ (q é a magnitude do vetor de espalhamento e R_g é o raio de giração), fornece evidências da presença ou ausência de agregação, que se manifesta com um

aumento de intensidade em baixos valores de “q”, ou interferências interpartícula, que se manifesta como uma diminuição da intensidade em baixos valores de “q”.²²⁶ Desta forma, o comportamento observado à baixos ângulos para o gráfico de Guinier ($\ln I$ vs q^2) obtido a partir dos filmes de gelatina e caseína (Figura 15) indicou que houve agregação significativa das moléculas na região avaliada.

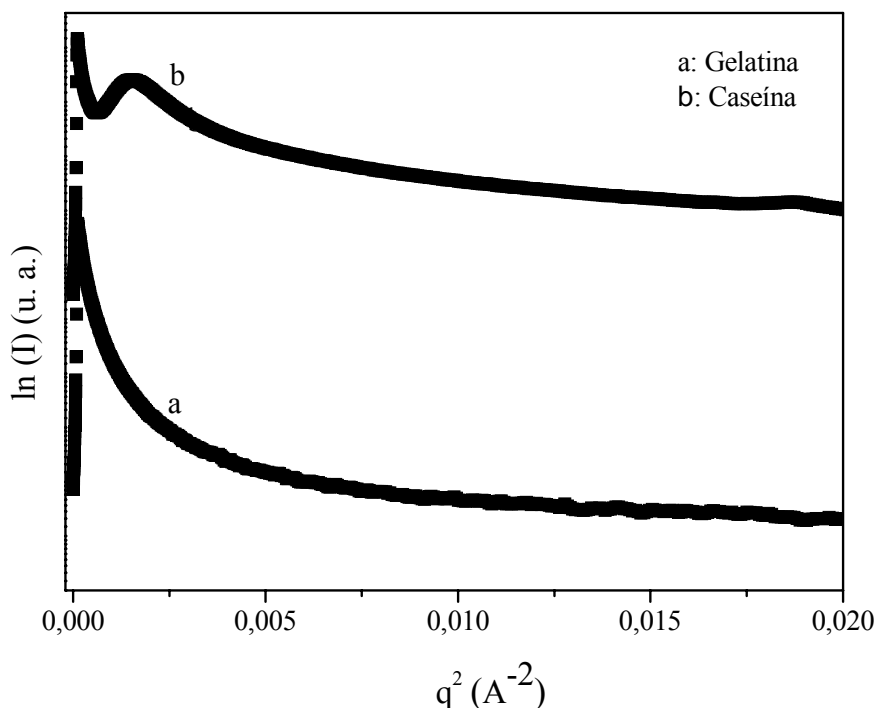


Figura 15. Gráfico de Guinier dos filmes de gelatina e caseína.

A Figura 16 mostra as curvas de SAXS obtidas para os filmes de gelatina e caseína. A curva de espalhamento referente à gelatina pura apresentou um pico em $0,5202 \text{ \AA}^{-1}$, indicando a presença de uma fonte de espalhamento na amostra que pode ser relacionada com a distância (d) entre agregados da proteína através da aplicação da Equação de Bragg (Eq. 20). Nas demais amostras também foram observados picos de espalhamento e desta forma foram obtidas as distâncias entre os agregados de proteína nos filmes. Os valores de d encontrados para os filmes de gelatina/caseína 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 e 0/100 foram, respectivamente 1,208; 1,162; 1,1305; 1,1681 e 0,9943 nm. De uma forma geral foi observado que o aumento da quantidade de caseína na mistura reduziu a distância entre as partículas provavelmente devido a uma maior interação parcial entre os componentes.

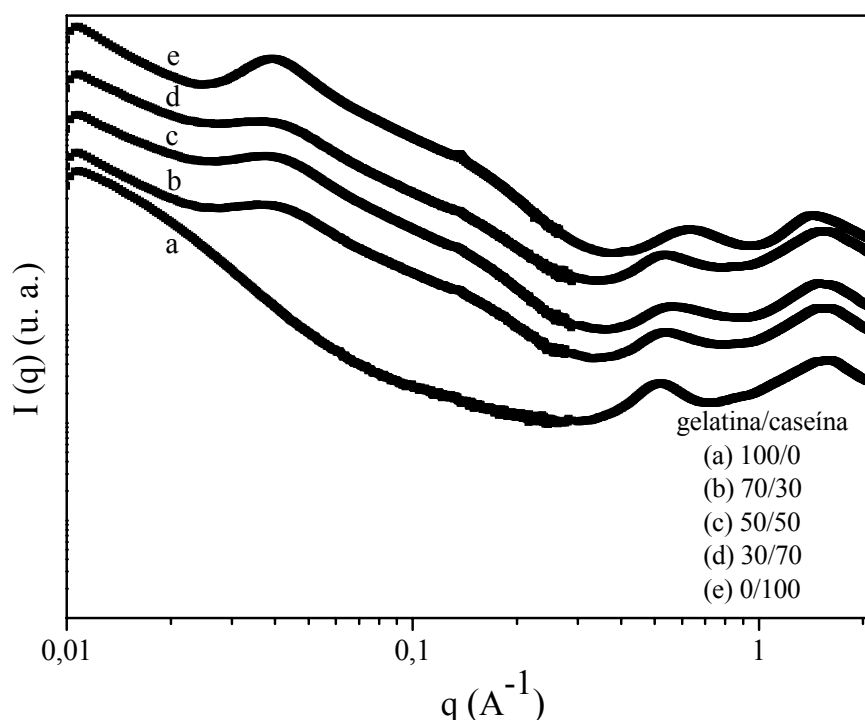


Figura 16. Curvas de SAXS obtidas para os filmes de gelatina/caseína.

2.6. Análise mecânica

Quando uma tensão é exercida sobre um corpo sólido, este tenderá a sofrer deformação. A razão entre a tensão aplicada e a deformação ocorrida define o módulo do material. Se o tipo de deformação à qual o material está sujeito é a tração, o módulo determinado é o de elasticidade ou de Young (MY), que é obtido através da inclinação da curva de tensão *versus* deformação na região elástica.⁷⁹ Além deste parâmetro, a tensão de ruptura (TR) e a elongação (E) também foram avaliadas neste estudo e os resultados obtidos para os filmes formados por gelatina/caseína na presença ou não de aditivos nas UR de 43, 75 e 94 % estão apresentados na Tabela 8.

Filmes formados por gelatina/caseína sem aditivos apresentaram valores de TR na faixa de 15 – 37 MPa, 14 – 53 MPa e 10 – 56 MPa quando avaliados nas UR de 43, 75 e 94 %, respectivamente. Filmes de gelatina apresentaram maiores valores de TR que filmes de caseína, como mostra a Tabela 8 e a Figura 17. Este resultado pode estar associado à contribuição de uma estrutura organizada pré-existente na gelatina. Durante a gelatinização e o processo de formação do filme, a gelatina pode readquirir parte da estrutura tripla-hélice do colágeno, que é uma proteína organizada, resultando em uma morfologia fibrosa.¹⁰⁶ A diferença entre os valores de TR apresentados pelo filme de gelatina em relação aos reportados na literatura (73²¹⁶ e 15 MPa,¹²⁴ ambos obtidos sob UR de 50 %) pode ser atribuída às diferentes fontes de gelatina, UR

empregada, processo de elaboração e espessura do filme. Para a caseína, os valores reportados na literatura variaram de 6,0 a 9,0 MPa para β -caseína¹¹⁴ e 0,83 – 15,12 MPa para filmes de caseína obtidos utilizando renina.¹¹² Novamente, parece claro que as diferenças observadas estão associadas a variação na espessura, processo de elaboração do filme, tipo de caseína, temperatura, umidade relativa e velocidade da tração.¹⁰⁶

A plasticização altera substancialmente todas as propriedades mecânicas dos filmes poliméricos, ocasionando, geralmente, aumento na elongação e diminuição na resistência a tensão e no módulo de elasticidade. Este resultado está associado ao aumento do volume livre e da mobilidade do polímero devido a presença do agente plastificante, que leva à diminuição das interações intermoleculares entre as cadeias e torna os filmes mais flexíveis. De maneira geral foi observado que a adição de sorbitol diminuiu os valores de TR dos filmes em relação ao sistema puro, como esperado, resultando em valores na faixa de 10 - 53 MPa, 3 – 24 MPa e 10 – 20 MPa quando avaliados nas UR de 43, 75 e 94 %, respectivamente. Valores menores de TR foram obtidos para os filmes plastificados e analisados sob UR 94 %, provavelmente devido ao fato da água também atuar como um plastificante adicional, diminuindo, conseqüentemente, a resistência do material. De acordo com a literatura, filmes de gelatina e caseína plastificados com glicerol e analisados sob UR de 50 % apresentaram valores de TR de 35,5 MPa e 12,1 MPa, respectivamente.¹⁰⁶

Filmes de gelatina/caseína reticulados apresentaram valores de TR na faixa de 21 - 50 MPa, 7 – 11 MPa e 10 – 30 MPa quando analisados sob UR de 43, 75 e 94 %, respectivamente. Estes valores foram menores que os obtidos para os respectivos sistemas puros analisados nas UR de 75 e 94 %, sugerindo que o processo de reticulação contribuiu para a desestabilização da rede protéica, ou seja, diminuiu as interações intramoleculares das proteínas e, conseqüentemente, a resistência do material. O EDC pode ter destruído a estrutura α -hélice da gelatina além de ter afetado os segmentos de κ -caseína, uma vez que a reticulação deva ocorrer predominantemente na superfície da micela. O efeito plastificante provocado pela água (devido às elevadas UR utilizadas) provavelmente contribuiu para a redução dos valores de TR. Por outro lado, os resultados referentes aos filmes de gelatina e caseína reticulados e analisados sob UR de 43 % foram superiores aos obtidos para estes filmes sem aditivos. A UR utilizada para estes filmes não foi suficiente para a água funcionar como plastificante. Na literatura foram encontrados valores de TR na faixa de 14 - 23 MPa para filmes de gelatina reticulados com transglutaminase, formaldeído ou glioxal e analisadas sob UR de 50%.¹²⁴

Tabela 8. Propriedades mecânicas dos filmes nas UR 43, 75 e 94 %.

Gel/Cas (% m/m)	UR 43%			UR 75%			UR 94%		
	TR ⁽¹⁾	E ⁽²⁾	MY ⁽¹⁾	TR ⁽¹⁾	E ⁽²⁾	MY ⁽¹⁾	TR ⁽¹⁾	E ⁽²⁾	MY ⁽¹⁾
100/0	36,9±4,7	3,9±0,7	178,6±22,3	52,7±5,4	5,9±0,8	215,8±11,4	33,3±2,5	12,3±0,9	298,1±21,6
70/30	35,9±3,5	5,1±1,2	180,0±18,3	39,7±2,1	4,9±1,2	192,6±15,6	35,2±1,7	17,9±3,5	142,1±12,3
50/50	26,9±3,1	5,0±0,7	149,4±8,9	38,2±4,2	6,5±1,6	181,8±10,0	50,5±1,7	14,9±0,2	176,2±13,6
30/70	26,4±3,5	4,7±1,2	146,4±15,4	31,0±3,2	7,0±3,0	154,9±12,9	55,5±2,6	17,7±1,2	205,0±13,1
0/100	15,4±1,9	2,5±0,4	106,2±13,4	14,2±2,6	1,5±0,5	139,1±17,4	10,1±0,0	12,1±0,7	181,1±10,1
100/0 ⁽³⁾	52,7±4,6	8,0±2,8	149,5±16,8	23,7±1,5	6,5±0,5	100,1±16,4	10,3±1,0	67,0±2,2	115,2±1,0
70/30 ⁽³⁾	36,7±7,0	14,0±3,8	131,2±10,0	17,7±1,7	24,5±2,5	47,3±3,7	14,2±1,5	50,5±2,0	50,0±2,2
50/50 ⁽³⁾	33,8±5,8	10,9±3,9	124,2±10,5	15,6±1,1	33,3±2,0	35,6±2,6	15,2±1,3	52,0±0,9	51,1±1,3
30/70 ⁽³⁾	22,8±2,0	13,1±3,7	94,0±10,0	14,1±1,5	31,6±3,4	37,5±4,1	10,2±1,6	39,5±9,2	10,9±0,6
0/100 ⁽³⁾	10,7±1,5	6,7±2,7	63,8±18,7	3,2±1,3	22,3±5,5	34,0±3,6	20,1±1,0	49,4±3,6	8,3±0,9
100/0 ⁽⁴⁾	50,0±1,6	10,3±2,6	167,3±5,1	8,4±2,1	14,1±3,0	173,2±14,3	17,2±1,7	15,0±1,9	131,1±12,1
70/30 ⁽⁴⁾	30,3±3,2	21,2±7,9	102,0±21,6	10,5±3,1	22,8±4,2	136,1±15,1	27,3±2,5	14,9±1,0	90,2±10,1
50/50 ⁽⁴⁾	29,2±4,1	11,3±3,4	140,3±23,9	7,0±2,2	32,5±3,0	44,0±1,8	30,3±1,8	21,3±1,8	43,2±8,2
30/70 ⁽⁴⁾	24,7±4,4	13,9±2,8	96,0±16,2	5,5±1,7	34,2±6,9	59,1±2,2	18,8±2,4	27,3±3,6	71,1±9,4
0/100 ⁽⁴⁾	21,0±1,7	8,6±2,3	119,0±11,8	7,2±2,5	51,0±20,5	63,1±5,7	10,7±1,0	39,1±7,5	30,5±2,2

⁽¹⁾ MPa; ⁽²⁾ %; ⁽³⁾ com 20 % sorbitol; ⁽⁴⁾ com 40 mM EDC.

A Figura 17 apresenta a tendência quanto a variação nos valores de E obtidos para os filmes de gelatina/caseína (na presença e ausência de aditivos) nas UR estudadas. Filmes de gelatina/caseína sem aditivos apresentaram valores de E na faixa de 2 – 5 %, 1 – 7 % e 12 – 18 %, nas UR de 43, 75 e 94 %, respectivamente. Na presença de plastificante os valores obtidos foram na faixa de 6 - 14 %, 6 – 33 % e 39 – 67 MPa, analisados nas mesmas UR, respectivamente. Em geral foi observado em ambos os sistemas (puro e plastificado) que o aumento da UR favoreceu a elongação dos filmes pois a água exerceu a função de um plastificante adicional. Geralmente o aumento da TR é seguido pela redução da E, o que não foi observado em alguns casos neste trabalho provavelmente devido a uma relaxação da cadeia polimérica.²²⁷ Também foi verificado que a maioria das blendas analisadas sob UR de 43 e 75 % apresentaram maiores valores de E que os filmes formados pelas proteínas puras, ou seja, ocorreu um efeito sinérgico.¹⁰⁶ Este resultado não foi observado nos filmes analisados sob UR de 94 % provavelmente devido ao efeito de plasticização da água ter sobreposto o efeito sinérgico. De acordo com a literatura, filmes formados por gelatina obtida de peixe apresentaram elongação de 5,1 % enquanto filmes formados por gelatina bovina apresentaram E de 39,2 %, quando analisados na UR de 50 %.¹²⁴ A adição de polissacarídeos conduziu a um pequeno aumento na E destes filmes.

Filmes reticulados avaliados nas UR de 43 e 75 % apresentaram maiores valores de E em relação aos demais sistemas provavelmente devido a redução da interação entre as proteínas com a formação das ligações cruzadas, que podem ter contribuído para a formação de um material com características predominantemente amorfas. Os valores de E obtidos para os filmes reticulados foram na faixa de 8 – 21 %, 14 - 51 % e 14 – 39 % quando avaliados nas UR de 43, 75 e 94 %, respectivamente. Entre os filmes reticulados, a caseína foi a mais influenciada pelo aumento da UR possivelmente devido a sua organização protéica. Por outro lado a gelatina apresenta uma estrutura organizada que dificulta sua interação com a água. Trabalhos reportados na literatura também mostraram aumento da E dos filmes de gelatina/caseína reticulados com transglutaminase.¹⁰⁶ A reticulação promoveu um aumento da elasticidade e flexibilidade dos filmes, o que normalmente não é observado. Entretanto este é o desempenho observado para filmes de gelatina e caseína: os filmes de caseína são naturalmente fragmentados devido a natureza das micelas e a reticulação pode promover a formação de ligações covalentes intermicelares, resultando em filmes mais flexíveis. Em relação à gelatina, as moléculas são naturalmente empacotadas em uma conformação α -hélice rígida, que pode relaxar durante a reticulação e, conseqüentemente, aumentar a flexibilidade dos filmes.

Os valores de MY obtidos para os filmes de gelatina/caseína foram na faixa de 106 - 180 MPa, 139 - 216 MPa e 142 - 298 MPa, quando analisados nas UR de 43, 75 e 94 %, respectivamente (ver comparação na Figura 18). Em geral foi observada uma diminuição nos valores do MY com a adição de caseína sugerindo a formação de filmes menos rígidos. Este resultado pode estar associado à conformação rígida da estrutura α -hélice presente na gelatina, como mencionado, e concorda com os valores de tensão de ruptura. Os valores de MY obtidos para os filmes de gelatina/caseína plastificados foram na faixa de 63 - 150 MPa, 34 - 100 MPa e 8 - 115 MPa quando analisados nas UR de 43, 75 e 94 %, respectivamente. A adição de plastificante diminuiu os valores de MY dos filmes com o aumento da UR e em relação ao sistema puro pelos mesmos motivos citados anteriormente. Os resultados concordaram com os valores de elongação obtidos.

Os valores de MY encontrados para os filmes formados por gelatina/caseína na presença de EDC foram na faixa de 96 - 140 MPa, 44 - 173 MPa e 30 - 131 MPa, quando analisados sob UR de 43, 75 e 94 %, respectivamente. Os menores valores obtidos para os filmes reticulados em relação ao sistema puro podem estar associados à redução da interação entre as proteínas com a presença de EDC, que pode ter contribuído para a formação de um material amorfo, concordando com os valores de E e com os resultados obtidos para filmes de gelatina reticulados com glutaraldeído.²²⁸

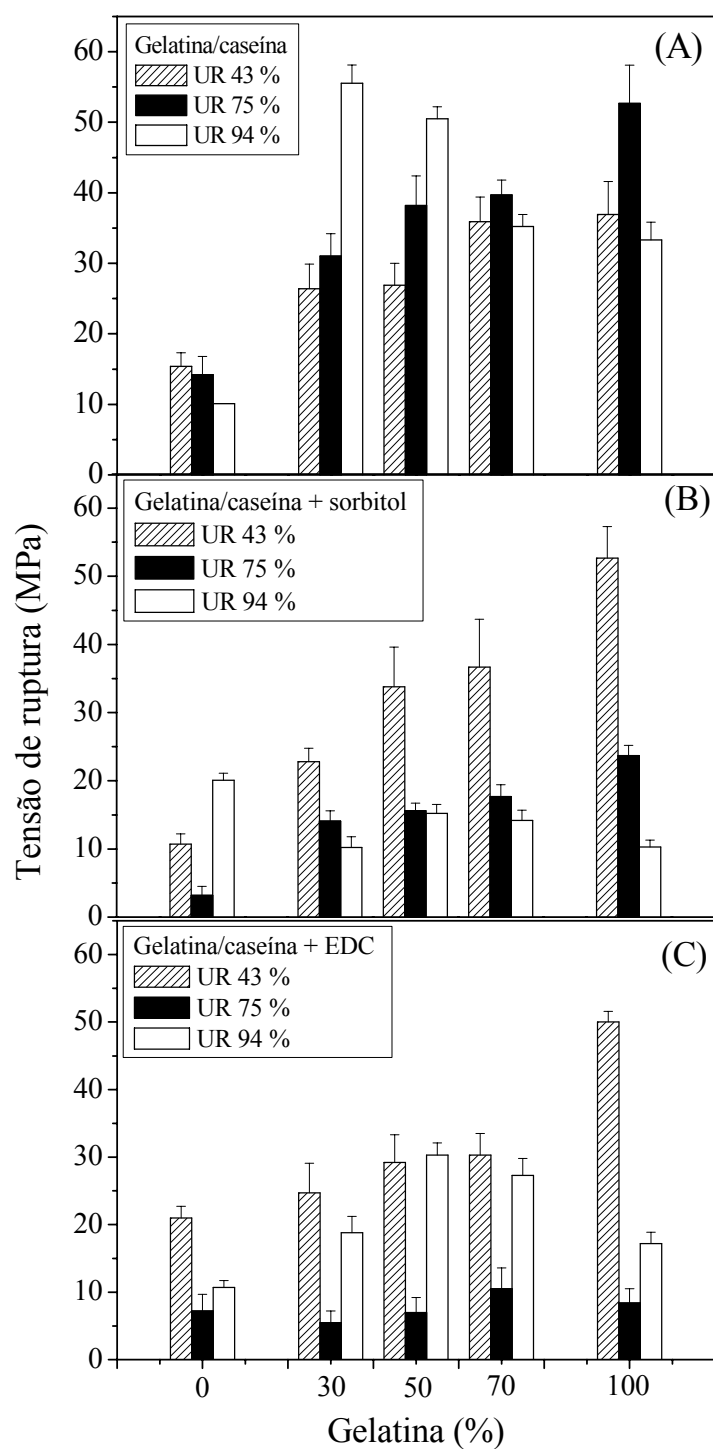


Figura 17. Valores de tensão de ruptura em função da composição dos filmes e da umidade relativa: (A) gelatina/caseína, (B) gelatina/caseína + sorbitol e (C) gelatina/caseína + EDC.

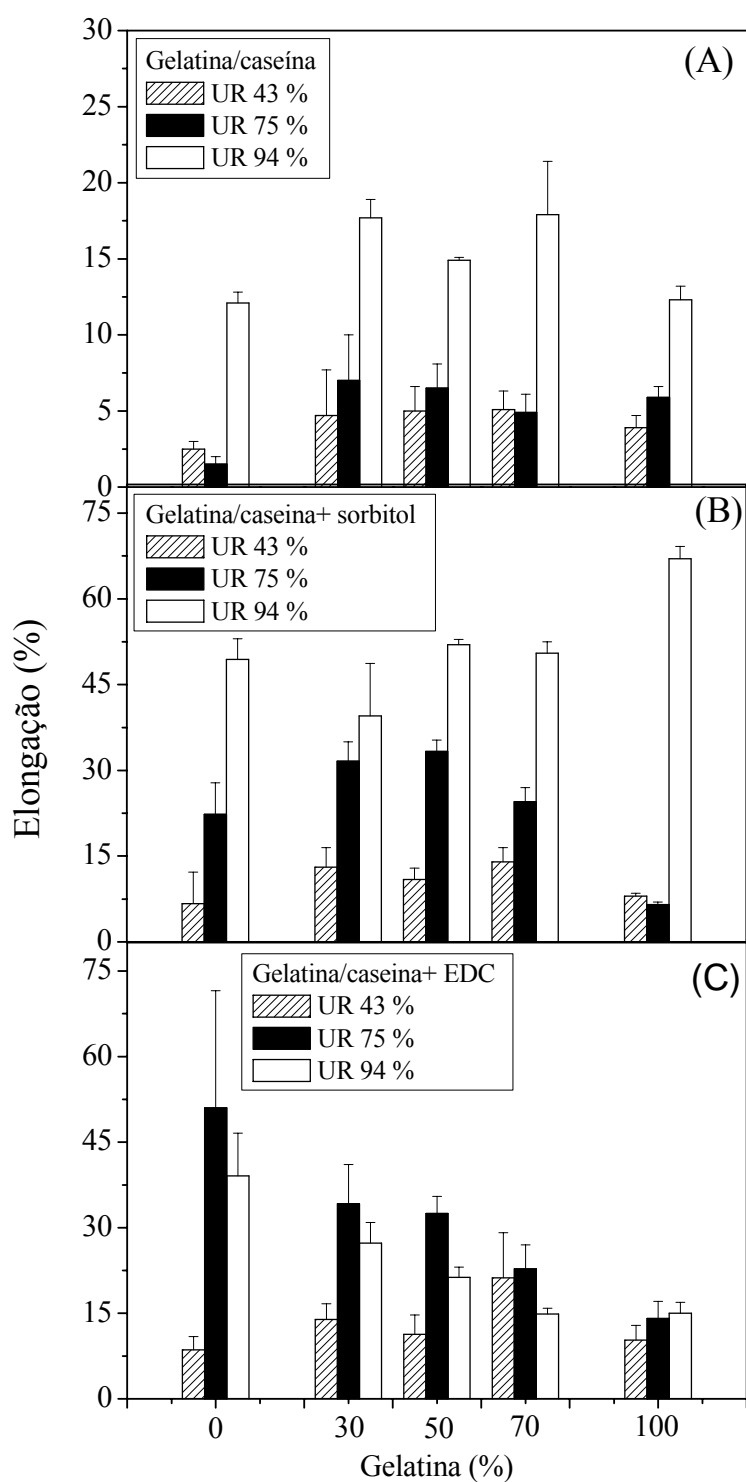


Figura 18. Valores de elongação em função da composição dos filmes e da umidade relativa: (A) gelatina/caseína, (B) gelatina/caseína + sorbitol e (C) gelatina/caseína + EDC.

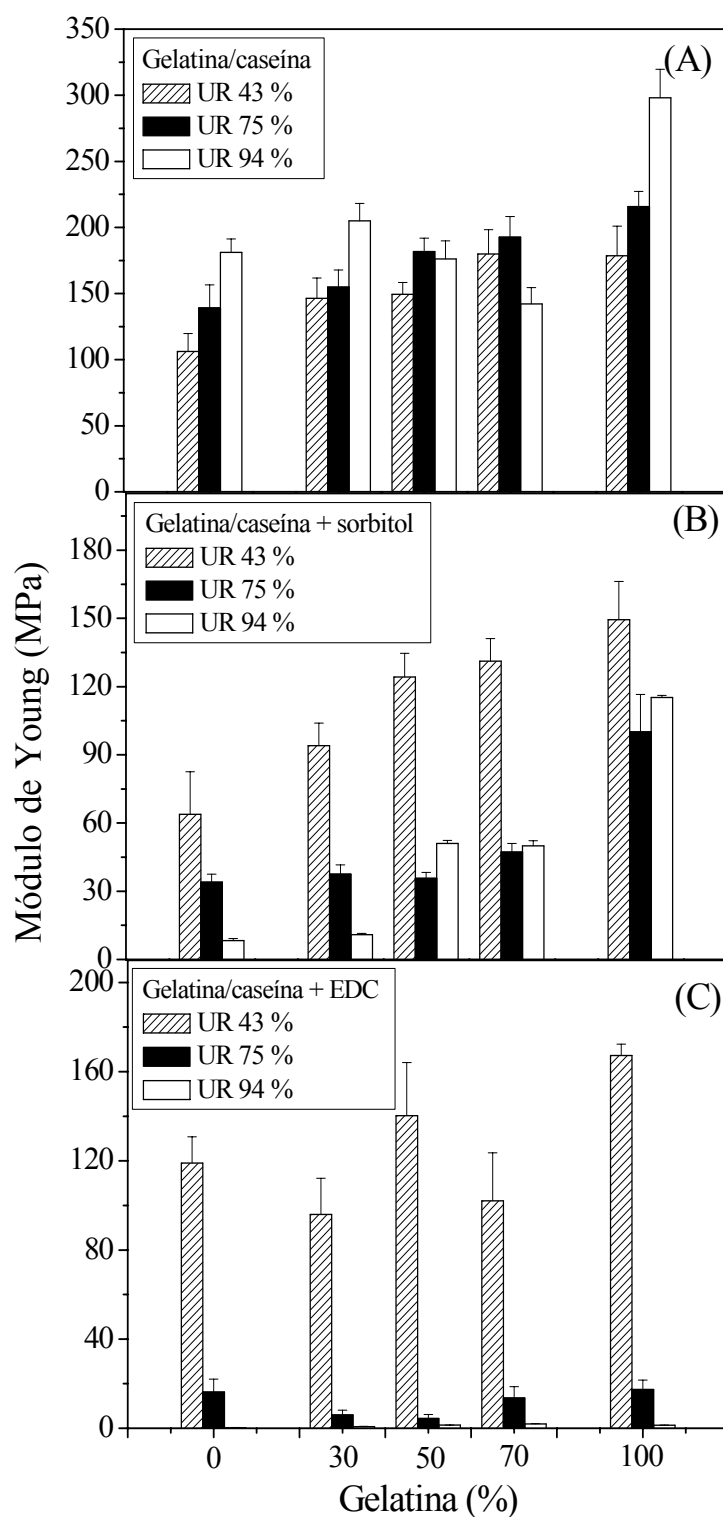


Figura 19. Valores de módulo de Young em função da composição dos filmes e da umidade relativa: (A) gelatina/caseína, (B) gelatina/caseína + sorbitol e (C) gelatina/caseína + EDC.

2.7. Análise termogravimétrica

As Tabelas 9 e 10 apresentam os resultados obtidos referentes à degradação térmica dos filmes de gelatina/caseína na presença ou ausência de aditivos, analisados sob atmosfera de nitrogênio e de ar sintético, respectivamente. A degradação térmica dos filmes em atmosfera inerte apresentou dois estágios de perda de massa enquanto os filmes degradados sob ar apresentaram três ou quatro estágios provavelmente devido à decomposição oxidativa dos produtos, diminuindo a quantidade de resíduo à 600 °C. O primeiro estágio de perda de massa obtido nas medidas realizadas em ambas atmosferas foi associado à perda de água ligada ou adsorvida aos filmes.

A Figura 20 apresenta as derivadas das curvas termogravimétricas obtidas para os filmes analisados sob atmosfera de nitrogênio. No principal estágio de degradação, a gelatina e a caseína apresentaram temperaturas de máxima velocidade de degradação ($T_{m\acute{a}x}$) de 348,2 °C (59,9 % de perda de massa) e 334,9 °C (59,2 % de perda de massa), respectivamente. Estes valores sugerem que a gelatina apresenta estabilidade térmica ligeiramente superior a da caseína. Por outro lado, as diferentes estruturas primárias e secundárias das proteínas não afetaram significativamente o processo de degradação sob atmosfera inerte. Durante o aquecimento, a estrutura ordenada (α -hélice e folhas- β) dos filmes é gradualmente destruída devido a ruptura das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares.¹⁰⁵ As blendas formadas por gelatina/caseína apresentaram valores de $T_{m\acute{a}x}$ semelhantes aos obtidos para as proteínas puras.

Os filmes plastificados analisados sob atmosfera inerte apresentaram menores valores de $T_{m\acute{a}x}$ em relação aos obtidos para os filmes do sistema puro. Assim como na análise mecânica, o sorbitol afetou a interação proteína-proteína, diminuindo, em consequência, a estabilidade térmica do sistema. Filmes de gelatina e de caseína plastificados apresentaram $T_{m\acute{a}x}$ em torno de 317 °C enquanto as blendas plastificadas apresentaram valores em torno de 322 °C. Estes resultados foram semelhantes aos valores obtidos da literatura para filmes de gelatina e de caseinato plastificados com sorbitol (320 - 326 °C).¹⁰⁵

A reticulação promoveu um aumento da estabilidade térmica dos filmes de caseína ($T_{m\acute{a}x}$ 353,8 °C), como esperado. Entretanto, os demais filmes formados por gelatina/caseína reticulados e analisados sob atmosfera inerte apresentaram valores de $T_{m\acute{a}x}$ similares (cerca de 337 °C) aos obtidos para o sistema puro. A gelatina apresenta uma forte rede de conexão intermolecular nos filmes não reticulados, com uma estrutura α -hélice bem definida, o que confere uma estabilidade extra ao filme. A reticulação levou a uma total ou parcial destruição desta rede, resultando na diminuição da estabilidade térmica destes filmes, concordando com os

resultados de análise mecânica. Resultados similares foram encontrados na literatura, com valores de $T_{\text{máx}}$ obtidos para a gelatina em 350 °C, gelatina plastificada em 316 °C e reticulada em 340 °C.¹²⁵

Tabela 9. Parâmetros termogravimétricos obtidos para os filmes de gelatina/caseína analisados sob atmosfera inerte.

Sistema	Gel/cas (% m/m)	Estágio 1		Estágio 2		Resíduo a 600 °C
		M ^a	T ^b	M ^a	T ^b	
Puro	100/00	14,2	61,2	59,9	348,2	25,9
	70/30	11,8	73,9	56,8	334,6	31,4
	50/50	10,6	90,7	58,7	337,7	30,7
	30/70	9,7	92,4	60,5	346,6	29,8
	0/100	11,5	55,6	59,2	334,9	29,3
Sorbitol	100/00	11,5	87,6	66,5	316,5	22,0
	70/30	14,0	94,4	59,9	325,9	26,1
	50/50	12,4	99,6	60,6	324,5	27,0
	30/70	11,3	69,6	63,6	320,4	25,1
	0/100	11,9	86,3	61,3	318,4	26,8
EDC	100/00	11,1	75,2	64,8	334,4	24,1
	70/30	11,0	82,0	69,0	339,2	20,0
	50/50	11,3	67,7	68,3	338,8	20,4
	30/70	9,6	83,8	71,5	334,2	18,9
	0/100	12,7	74,2	55,0	353,8	32,3

^a Temperatura de máxima velocidade de degradação (°C).

^b Perda de massa em cada estágio de degradação (%).

A massa residual a 600 °C nas análises realizadas sob atmosfera inerte ficou em torno de 29 % para o sistema puro, 25 % para os filmes plastificados e 23 % para os filmes reticulados. Os valores similares obtidos podem ser atribuídos à semelhança nas estruturas das proteínas estudadas. A presença de aditivos reduziu a percentagem de massa residual obtida quando comparado ao sistema puro provavelmente devido à diminuição das ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas.

Tabela 10. Parâmetros termogravimétricos obtidos para os filmes de gelatina/caseína analisados sob atmosfera oxidante.

Sistema	Gel/cas (%m/m)	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Resíduo a 600 °C
		M ^a	T ^b	M ^a	T ^b	M ^a	T ^b	M ^a	T ^b	
Puro	100/0	16,4	62	43,5	350	34,5	566	-	-	5,6
	70/30	11,5	72	45,9	340	39,0	560	-	-	3,6
	50/50	13,2	58	44,0	339	37,4	546	-	-	5,4
	30/70	7,7	102	50,5	344	36,6	548	-	-	5,2
	0/100	7,6	75	47,4	326	37,8	527	-	-	7,2
Sorbitol	100/0	11,5	103	56,6	303	-	-	27,3	583	4,6
	70/30	11,5	40	54,2	306	29,9	559	-	-	4,4
	50/50	13,6	67	52,8	302	28,5	566	-	-	5,1
	30/70	11,0	106	53,4	303	30,5	534	-	-	5,1
	0/100	10,1	96	53,0	316	28,5	544	-	-	8,4
EDC	100/0	10,1	70	54,9	328	16,3	540	8,5	586	10,2
	70/30	9,1	78	51,5	328	14,4	520	7,9	592	17,1
	50/50	13,3	68	51,2	331	26,9	555	-	-	8,6
	30/70	9,7	73	55,9	328	-	-	16,3	585	18,1
	0/100	11,0	97	53,0	340	12,4	538	7,7	585	15,9

^a Temperatura de máxima velocidade de degradação (°C).^b Perda de massa em cada estágio de degradação (%).

A Figura 21 apresenta as derivadas das curvas termogravimétricas obtidas para os filmes analisados sob atmosfera oxidativa. O aumento no número de estágios de degradação e o menor valor de T_{máx} obtido no segundo estágio sugerem que os filmes degradados sob ar são menos estáveis termogravimetricamente em relação aos degradados sob atmosfera inerte.

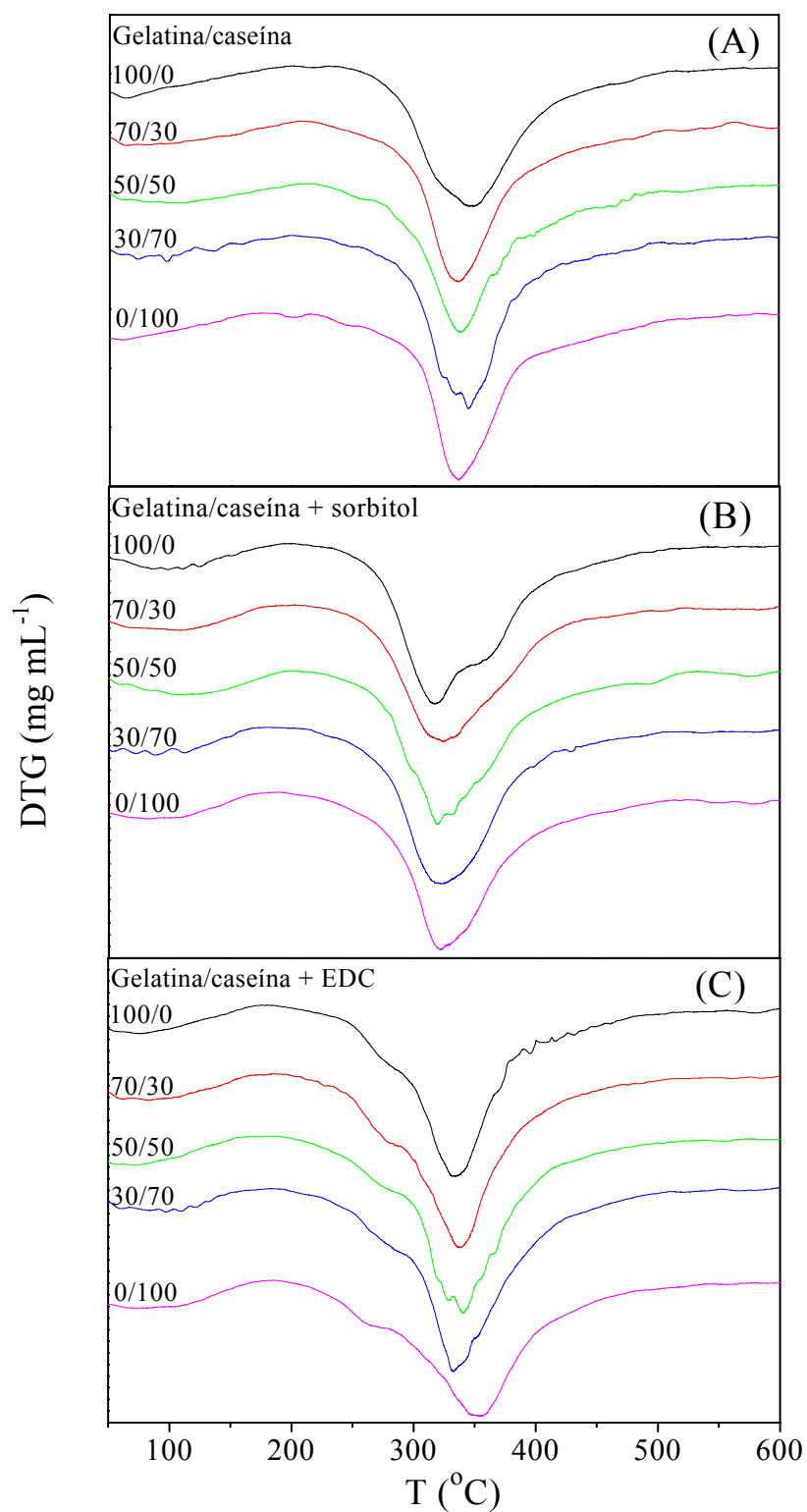


Figura 20. Derivadas das curvas termogravimétricas obtidas para os filmes de gelatina/caseína na ausência de aditivos (A), plastificados (B) e reticulados (C) analisados sob atmosfera inerte.

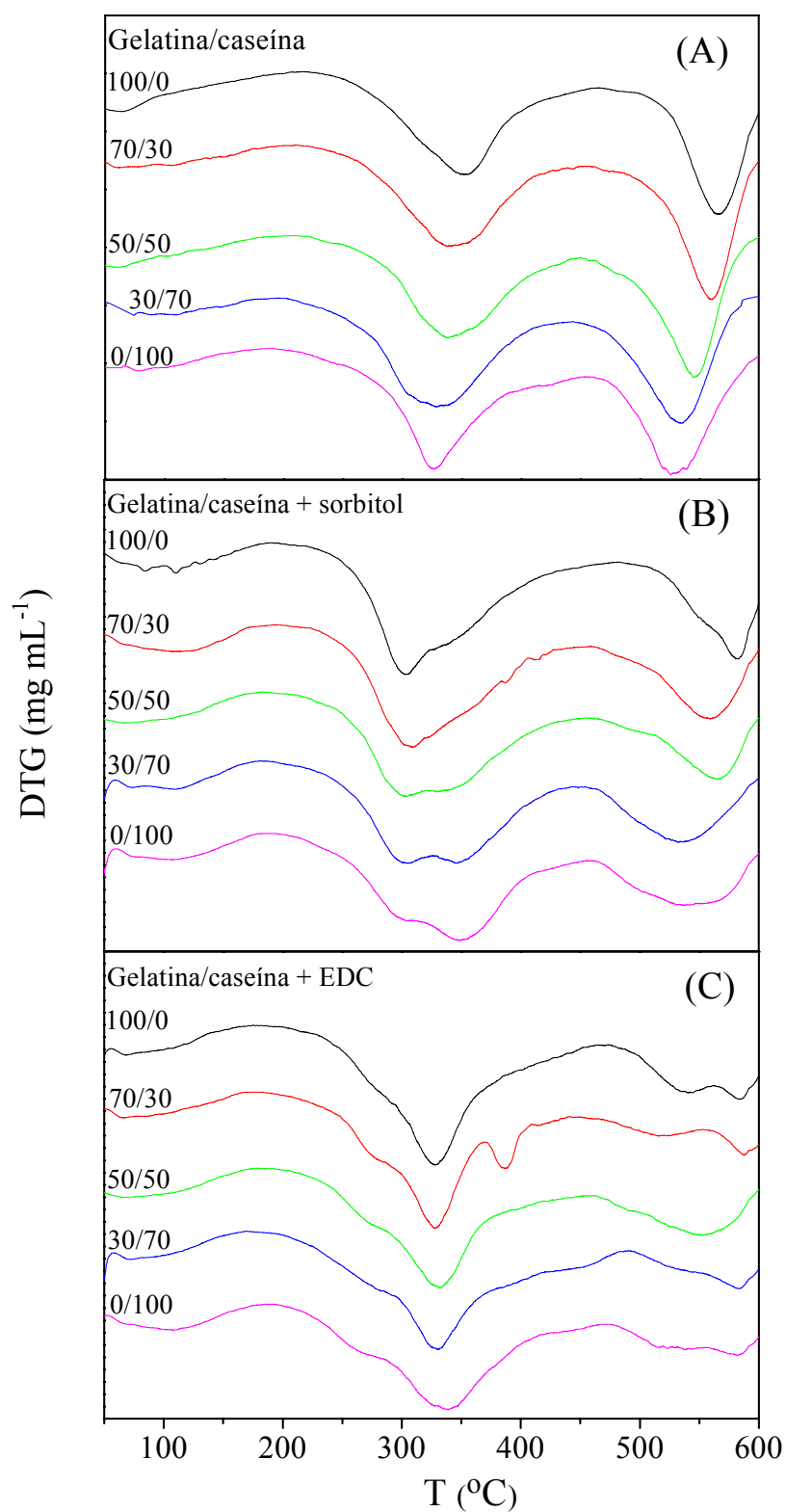


Figura 21. Derivadas das curvas termogravimétricas obtidas para os filmes de gelatina/caseína na ausência de aditivos (A), plastificados (B) e reticulados (C) analisados sob atmosfera oxidante.

Além da perda de umidade, os filmes de gelatina/caseína sem aditivos apresentaram estágios de perda de massa em 326 - 350 °C (43 - 50 % de perda de massa) e 527 - 566 °C (34 - 39 % de perda de massa) quando degradados sob atmosfera oxidativa. A adição de sorbitol diminuiu os valores de T_{máx} obtidos no segundo estágio (302 -316 °C) quando comparado aos filmes de gelatina/caseína sem aditivos. Este resultado indicou uma diminuição da estabilidade térmica do sistema plastificado, provavelmente devido à redução das forças de interação entre as cadeias poliméricas quando sorbitol foi adicionado, similarmente ao ocorrido nas análises realizadas sob atmosfera inerte. Os filmes formados por gelatina/caseína plastificados também apresentaram perda de massa de 27 - 31 % na faixa de 534 - 583 °C.

A análise termogravimétrica dos filmes de gelatina/caseína reticulados e degradados sob atmosfera oxidativa revelou a formação de estágios de perda de massa em 328 - 340 °C, 520 - 555 °C e 585 - 592 °C. Em geral foi observado que os filmes reticulados degradados sob atmosfera oxidativa apresentaram diminuição da estabilidade térmica quando comparados aos resultados obtidos para os filmes do sistema puro, provavelmente devido a destruição total ou parcial das estruturas α -hélice e folhas β -pregueada, como comentado anteriormente. A massa residual obtida a 600 °C nas análises realizadas sob atmosfera oxidativa foi em torno de 3 - 9 % para os sistemas puro e plastificado e 8 - 18 % para os filmes reticulados.

3. Aplicação dos filmes de gelatina/caseína

Os filmes de gelatina/caseína foram analisados em relação a possível aplicação nas áreas de embalagem e coberturas para frutas, na liberação controlada de fármacos e como suporte para adesão celular. Na primeira aplicação citada foram avaliados os sistemas puro, plastificado e reticulado enquanto nas demais foram utilizados apenas o sistema reticulado com EDC pelo fato deste apresentar menor solubilidade em meio aquoso.

3.1. Revestimento de maçãs Fuji

Maçãs Fuji minimamente processadas (MP) foram utilizadas neste estudo e as análises foram realizadas no segundo e no nono dia após o processo de revestimento das mesmas. Os resultados dos parâmetros avaliados estão apresentados nas Tabelas 11 (SST e pH) e 12 (firmeza e fraturabilidade). As maçãs tratadas com os ácidos cítrico (AC) e ascórbico (AA) apresentaram

uma coloração levemente mais clara em relação as demais amostras, evidenciando o poder antioxidante desses ácidos ao evitar o escurecimento enzimático.

Tabela 11. Valores de SST e de pH obtidos.

Solução de revestimento	SST (°Brix)		pH	
	2º dia	9º dia	2º dia	9º dia
Água	8,00 ± 0,00	6,38 ± 0,48	4,37 ± 0,18	4,53 ± 0,02
Ácidos	7,33 ± 0,58	10,6 ± 2,41	4,53 ± 0,01	4,35 ± 0,02
Gelatina	7,33 ± 0,58	9,25 ± 1,27	4,32 ± 0,03	4,33 ± 0,13
Gel/cas 50/50	8,00 ± 1,00	9,50 ± 1,29	4,73 ± 0,06	4,10 ± 0,00
Caseína	9,33 ± 0,58	7,50 ± 0,58	4,36 ± 0,12	4,35 ± 0,04
Gel + ácidos	8,00 ± 0,00	7,50 ± 1,00	4,56 ± 0,05	4,37 ± 0,06
Gel/cas 50/50 + ácid.	6,33 ± 0,58	8,00 ± 0,71	4,51 ± 0,06	4,36 ± 0,10
Cas + ácidos	7,33 ± 0,58	7,00 ± 0,00	4,35 ± 0,02	4,59 ± 0,03
Gel + sorb	7,66 ± 0,58	8,50 ± 0,71	4,60 ± 0,02	4,64 ± 0,11
Gel/cas 50/50 + sorb	8,33 ± 0,58	9,30 ± 0,84	4,49 ± 0,09	4,36 ± 0,14
Cas + sorb	7,00 ± 0,00	8,50 ± 1,00	4,50 ± 0,17	4,66 ± 0,00
Gel + sorb + ácidos	8,33 ± 0,58	9,08 ± 1,56	4,42 ± 0,06	4,58 ± 0,05
Gel/cas 50/50 +sorb+ácid.	9,00 ± 0,00	8,50 ± 0,58	4,36 ± 0,04	4,26 ± 0,02
Cas + sorb + ácidos	8,33 ± 0,58	9,90 ± 1,60	4,48 ± 0,13	4,68 ± 0,01
Gel + EDC	7,66 ± 0,58	8,50 ± 1,12	4,52 ± 0,01	4,42 ± 0,16
Gel/cas 50/50 + EDC	8,33 ± 0,58	8,60 ± 1,14	4,46 ± 0,39	4,03 ± 0,14
Cas + EDC	6,33 ± 0,58	7,40 ± 1,14	4,76 ± 0,04	4,65 ± 0,11
Gel + EDC + ácidos	8,00 ± 1,00	7,00 ± 0,00	4,58 ± 0,18	4,40 ± 0,06
Gel/cas 50/50 +EDC+ácid	7,00 ± 0,00	8,00 ± 1,00	4,31 ± 0,08	4,43 ± 0,00
Cas + EDC + ácidos	6,67 ± 0,58	7,38 ± 0,48	4,41 ± 0,10	4,37 ± 0,11

Gel: gelatina; Cas: caseína; ácid: ácidos ascórbico e cítrico; sorb: sorbitol

As amostras revestidas pelos filmes plastificados ou reticulados apresentaram aumento na concentração de SST no nono dia de análise, indicando maior presença de açúcar na fruta em relação à medida realizada no segundo dia, o que sugere uma melhor qualidade da mesma. O aumento do teor de sólidos solúveis pode ser devido à perda de umidade e/ou reações enzimáticas (degradação do amido e substâncias pécticas e celulósicas),²²⁹ concordando com as medidas de PVA em relação aos filmes reticulados. Os resultados obtidos podem ainda estar

relacionados ao próprio processo de maturação da fruta e à menor atividade respiratória relacionada à queda na produção de etileno, como observado em maçãs tratadas com 1-metilciclopropeno.²³⁰

Tabela 12. Valores de firmeza e de fraturabilidade obtidos.

Solução de revestimento	Firmeza (g)		Fratura (g)	
	2º dia	9º dia	2º dia	9º dia
Água	909,12 ± 0,43	935,47 ± 13,20	141,57 ± 5,79	123,21 ± 13,98
Ácidos	911,86 ± 21,78	743,98 ± 80,64	109,84 ± 31,66	201,95 ± 61,47
Gelatina	919,03 ± 23,33	609,05 ± 67,76	229,36 ± 40,94	257,38 ± 75,87
Gel/cas 50/50	899,92 ± 16,87	893,23 ± 16,34	223,50 ± 44,21	290,94 ± 44,45
Caseína	899,06 ± 31,14	808,36 ± 48,37	244,27 ± 14,38	221,41 ± 31,04
Gel + ácidos	898,83 ± 12,93	243,48 ± 36,40	175,68 ± 10,94	242,30 ± 39,73
Gel/cas 50/50 + ácid.	860,57 ± 63,04	876,69 ± 23,36	146,82 ± 39,89	305,94 ± 55,77
Cas + ácidos	878,91 ± 61,90	619,10 ± 35,05	186,24 ± 34,80	250,34 ± 28,29
Gel + sorb	858,75 ± 53,34	585,67 ± 65,75	90,00 ± 11,30	191,76 ± 35,71
Gel/cas 50/50 + sorb	602,70 ± 25,13	675,40 ± 50,71	114,99 ± 8,27	237,90 ± 16,69
Cas + sorb	893,12 ± 63,16	619,10 ± 35,05	122,08 ± 25,92	267,00 ± 50,95
Gel + sorb + ácidos	617,19 ± 8,39	742,09 ± 76,64	118,43 ± 30,49	291,39 ± 47,98
Gel/cas 50/50 +sorb+ácid.	906,72 ± 21,90	851,06 ± 63,93	109,70 ± 25,08	295,29 ± 20,72
Cas + sorb + ácidos	884,12 ± 57,48	609,05 ± 67,76	178,37 ± 40,76	257,38 ± 75,87
Gel + EDC	762,81 ± 61,51	733,25 ± 58,97	153,44 ± 23,24	254,09 ± 29,82
Gel/cas 50/50 + EDC	853,99 ± 60,85	871,04 ± 26,68	180,75 ± 27,67	338,18 ± 34,36
Cas + EDC	906,71 ± 19,04	683,53 ± 84,44	151,87 ± 13,73	221,23 ± 42,28
Gel + EDC + ácidos	715,41 ± 48,23	753,60 ± 72,63	158,33 ± 34,46	206,14 ± 57,02
Gel/cas 50/50 +EDC+ácid	847,65 ± 84,61	851,06 ± 63,93	158,91 ± 14,25	295,29 ± 20,72
Cas + EDC + ácidos	644,37 ± 83,81	633,27 ± 18,27	121,45 ± 32,84	242,88 ± 31,94

Gel: gelatina; Cas: caseína; ácid: ácidos ascórbico e cítrico; sorb: sorbitol

Independente da composição da solução formadora de revestimento, as maçãs cobertas por filmes contendo 50 % de cada proteína apresentaram, no geral, os maiores valores de SST dentro de cada sistema (puro, plastificado e reticulado, contendo ou não AC e AA). A provável não homogeneização das coberturas sobre as amostras, principalmente das soluções contendo EDC, deve ter sido o principal motivo para a variação dos resultados obtidos. Os valores de SST

encontrados em nosso estudo (faixa de 6,33 a 9,33 °Brix após 2 dias e de 6,38 a 10,60 °Brix após 9 dias de revestimento) foram menores que os fornecidos pela literatura, principalmente para a amostra controle (8,0 e 6,38 °Brix, após 2 e 9 dias, respectivamente). Este comportamento pode estar relacionado ao baixo acúmulo de horas de sol durante o desenvolvimento dos frutos e ou pelo excesso de chuvas e alta umidade relativa.²³¹ De acordo com a literatura,²³² os teores de SST para as maçãs Fuji são de 13 a 14,4 °Brix no período correspondente à maturação comercial. Valor similar (14,2 °Brix) foi encontrado por Corrent e colaboradores²³⁰ para maçãs Fuji armazenadas por 8 meses a 0 °C.

As maçãs MP não apresentaram, no geral, mudanças significativas no pH quando as duas medidas realizadas foram comparadas (faixa de 4,03 - 4,68 no segundo dia e 4,31 - 4,76 no nono dia, Tabela 11). Para maçãs da cultivar Fuji, a manutenção de altos teores de acidez é uma característica importante, pois propicia melhor sabor em função do equilíbrio SST/acidez.²³³ Valores de pH tais como 3,86²³⁴ e 4,07²³⁵ foram encontrados na literatura.

A firmeza (Tabela 12) é um dos fatores que determina a aceitabilidade do alimento pelo consumidor. Os valores de firmeza encontrados no segundo dia mantiveram-se na faixa de 715 a 919 g com exceção, principalmente, para algumas amostras contendo sorbitol, as quais apresentaram valores entre 602 e 617 g. No nono dia, estes valores ficaram entre 585 – 935 g. No geral foi observado que após 1 semana houve diminuição significativa da firmeza, enquanto algumas amostras apresentaram um leve aumento. De acordo com a literatura, não tem sido observado a degradação da celulose durante a maturação da maçã, desta forma a redução da firmeza da polpa pode ser atribuída, principalmente, as atividades da poligalaturonase, beta-galactosidase e pectinesterase que degradam os polissacarídeos pécticos da parede celular e da lamela média.²³¹ Além disso, a resposta de um material à penetração pode ser afetada pela densidade e uniformidade da matriz, já que somente uma região da seção transversal é submetida à penetração.^{236,237} Desta forma não foi obtida uma relação entre a composição das membranas poliméricas e os resultados de firmeza apresentados, porém no geral foi observado que, dentro de cada sistema, as maçãs envolvidas nas blendas (na ausência ou presença de sorbitol ou EDC e/ou ácidos) apresentaram maiores valores de firmeza.

A maioria das amostras apresentou um aumento da fraturabilidade com o armazenamento (Tabela 12). Medidas realizadas no segundo dia apresentaram valores de fraturabilidade de 90 a 244 g e no nono dia valores de 123 a 338 g. No geral foi observado que, dentro de cada sistema, as maçãs envolvidas em caseína (na ausência ou presença de sorbitol ou EDC e/ou ácidos) apresentaram maiores valores nas medidas realizadas no segundo dia. Por outro lado, as maçãs envolvidas nas blendas (na ausência ou presença de S ou EDC e/ou ácidos) apresentaram

maiores valores no nono dia de medidas, concordando com os resultados de firmeza, uma vez que ambas estão relacionadas. De acordo com os resultados dos ensaios mecânicos, esperava-se que os filmes de gelatina (pura, plastificada ou reticulada) apresentassem maiores valores de fraturabilidade, pelo fato de ser uma proteína fibrosa e pela caseína apresentar menor ordem molecular. Como já mencionado, pode ter ocorrido uma não uniformidade na formação dos filmes sobre a maçã alterando a força de penetração, como mostram os elevados desvios-padrão obtidos em alguns casos.

Dentre todos os sistemas analisados não foi obtida uma cobertura comestível que apresentasse uma melhora em todos os parâmetros analisados. A provável não uniformidade na formação dos filmes sobre a maçã, os diferentes estágios de maturação e o tempo pós-colheita dos frutos devem ser os principais responsáveis pela alteração da força de penetração durante as medidas, influenciando o resultado final. Desta forma, medidas como permeabilidade aos gases que seriam avaliadas para uma melhor compreensão das trocas gasosas entre a fruta e o ambiente não foram realizadas.

3.2. Testes in vitro de liberação da p-hidroxiacetanilida e aplicação de modelos cinéticos

Os perfis de permeação do fármaco modelo p-hidroxiacetanilida (p-HAA) através de filmes de gelatina/caseína reticulados estão apresentados na Figura 22. Os filmes de gelatina e a blenda contendo 70 % deste polímero apresentaram permeação mais rápida do fármaco, sugerindo dependência direta com o grau de intumescimento (maior hidrofiliabilidade), que foi de 87,2 e 55,9 %, respectivamente. Em geral, a matriz intumescida apresenta maior espaço entre as cadeias poliméricas, aumentando, em consequência, as propriedades de permeação. As medidas de intumescimento dos filmes de gelatina/caseína reticulados foram discutidos no item 2.2.

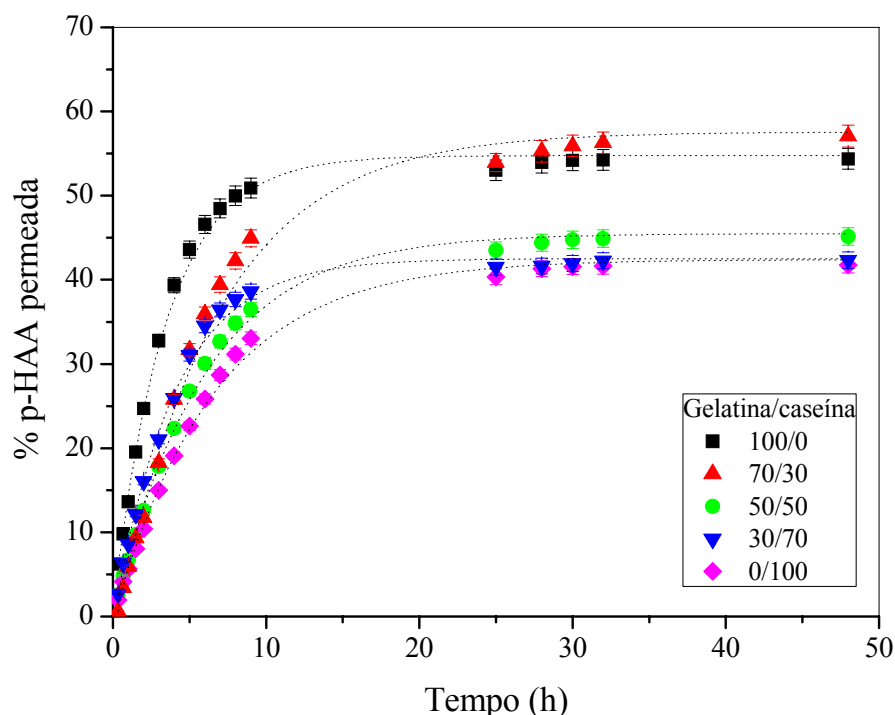


Figura 22. Perfis de permeação da p-hidroxiaacetanilida através dos filmes reticulados de gelatina/caseína em solução tampão pH 7,4 a 37 °C.

O equilíbrio da permeação do p-HAA no filme de gelatina foi atingido após 10 h de análise. Com a adição de caseína, os filmes diminuíram a velocidade de permeação do fármaco, atingindo equilíbrio apenas após 20 h. A velocidade de permeação ou fluxo, determinado a partir da inclinação da curva do gráfico, está apresentada na Tabela 13. Os resultados indicaram que o fluxo através do filme contendo 50 % de gelatina ($8,9 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) foi similar ao obtido para o filme de caseína ($7,6 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$), sugerindo que esta proteína foi capaz de modificar as propriedades da gelatina e concordando com os valores de coeficiente de permeabilidade. Valores similares também foram encontrados para o filme contendo 70 % ($10,5 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) e 30 % de gelatina ($10,4 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$).

Os perfis de permeação dos filmes reticulados foram plotados de acordo com modelos de cinética de primeira ordem e de ordem zero, Higuchi e lei de potência de acordo com as Equações 6 a 9 (Tabelas 13 e 14). Os filmes estudados não apresentaram bons resultados quando utilizada a Equação de primeira ordem (r^2 obtidos entre 0,89 e 0,92). Por outro lado, o modelo de ordem zero se ajustou aos filmes contendo 70 % de gelatina e apenas caseína, enquanto os filmes de gelatina e blendas contendo 70 % e 30 % deste polímero apresentaram boa correlação ($r^2 > 0,99$) quando avaliados pelo modelo de Higuchi (Tabela 14). Em adição, o sistema contendo 70

% de gelatina foi o único razoavelmente ajustável ao modelo da lei das potências ($r^2 = 0,98$) enquanto os demais apresentaram melhor correlação.

Tabela 13. Valores de fluxo, coeficiente de permeabilidade e cinética de liberação da p-hidroxiacetanilida considerando o modelo da lei de potências (Eq. 6).

Gel/cas (% m/m)	k (h^{-1})	n	r^2	Fluxo ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	Coef. permeab. ($\times 10^{-3} \text{ cm h}^{-1}$)
100/0	$22,65 \pm 1,03$	0,70	0,9953	$15,6 \pm 0,3$	$0,76 \pm 0,01$
70/30	$9,45 \pm 1,04$	1,01	0,9815	$10,5 \pm 0,2$	$0,51 \pm 0,01$
50/50	$11,02 \pm 1,01$	0,84	0,9992	$8,9 \pm 0,2$	$0,44 \pm 0,01$
30/70	$13,29 \pm 1,07$	0,83	0,9934	$10,4 \pm 0,2$	$0,51 \pm 0,01$
0/100	$9,12 \pm 1,02$	0,87	0,9988	$7,6 \pm 0,2$	$0,37 \pm 0,01$

Tabela 14. Cinética de liberação da p-hidroxiacetanilida através dos filmes reticulados considerando os modelos de ordem zero, primeira ordem e de Higuchi.

Gelatina/caseína	Ordem zero (Eq. 18)		Primeira ordem (Eq. 19)		Higuchi (Eq. 20)	
	k_o (h^{-1})	r^2	k_I (h^{-1})	r^2	k_H ($\text{h}^{-0,5}$)	R^2
100/0	$9,18 \pm 0,91$	0,9496	$0,32 \pm 0,05$	0,9111	$33,52 \pm 1,47$	0,9915
70/30	$9,03 \pm 0,40$	0,9921	$0,26 \pm 0,04$	0,9175	$26,52 \pm 4,65$	0,9962
50/50	$6,80 \pm 0,35$	0,9854	$0,33 \pm 0,05$	0,9177	$22,46 \pm 1,02$	0,9888
30/70	$7,91 \pm 0,51$	0,9798	$0,32 \pm 0,06$	0,8911	$23,33 \pm 1,08$	0,9902
0/100	$6,10 \pm 0,24$	0,9915	$0,30 \pm 0,04$	0,9111	$20,00 \pm 1,00$	0,9866

Os valores de coeficiente angular (n) obtidos pela lei de potências (0,70 – 0,87) e apresentados na Tabela 13 indicaram que o mecanismo de difusão e erosão predominaram na permeação do p-HAA em todos os filmes, exceto para o formado por 70 % de gelatina. Neste caso ($n = 1,01$) a cinética foi associada aos mecanismos de difusão e erosão, relaxação das cadeias e intumescimento.¹⁸³ As constantes cinéticas determinadas (k) e o fluxo de permeação à p-HAA foram semelhantes entre a caseína e o filme contendo 50 % deste polímero. Entretanto, seguindo a tendência observada nas medidas de intumescimento, estes valores foram menores que os determinados para os filmes de gelatina.

3.3. Testes de adesão celular

Após estabelecida a adesão (ancoragem) sobre o substrato, as células passam a alterar sua morfologia, crescimento, proliferação, padrão de diferenciação e comportamento.²³⁸ Neste trabalho, análises de adesão celular realizadas com o auxílio de microscopia óptica (resultados não apresentados) e eletrônica (Figura 23) mostraram células arredondadas (com estrutura mais fechada), sugerindo que as mesmas não aderiram adequadamente nos filmes de gelatina/caseína reticulados.

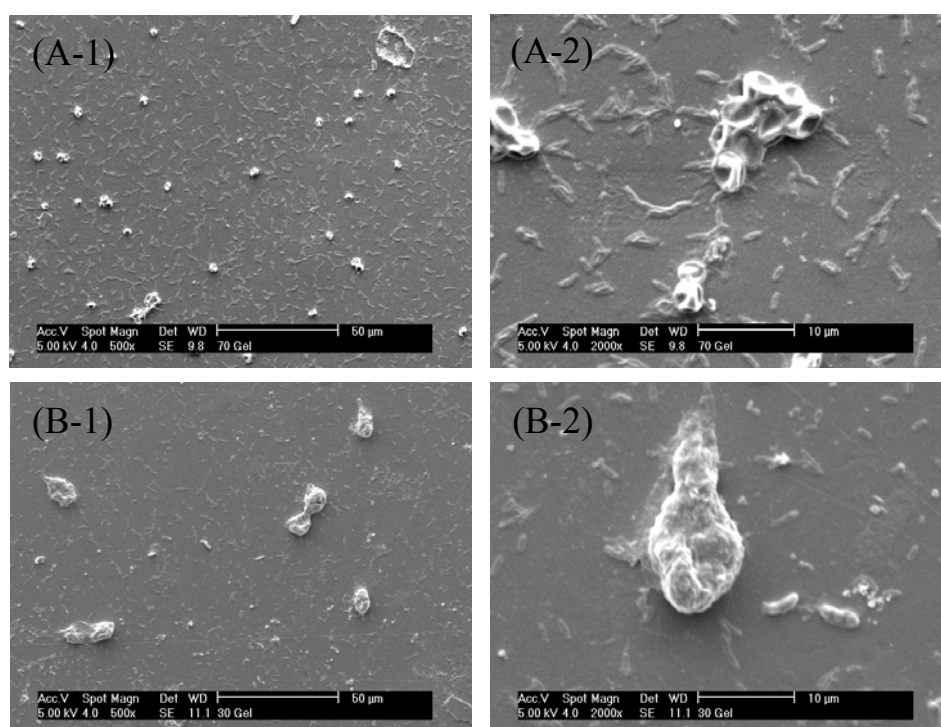


Figura 23. Análise de MEV das células sob os filmes reticulados: (A) gel/cas 70/30 e (B) gel/cas 30/70 nos aumentos de (1) 500x e (2) 2000x.

Sabe-se que a hidrofiliabilidade é um dos fatores mais importantes que afetam a citocompatibilidade dos biomateriais, uma vez que a adesão e o crescimento das células nas superfícies são considerados como sendo fortemente influenciados pelo balanço hidrofílico/hidrofóbico (molhabilidade). Trabalhos relatam que a maior parte das células prefere se ancorar em superfícies hidrofílicas,²³⁹⁻²⁴¹ preferencialmente em materiais com ângulo de contato menor que 60°. ²⁴² Desta forma, a hidrofobicidade pode explicar a falta de aderência entre as células e os filmes de gelatina/caseína reticulados, conforme sugerido pelos experimentos de ângulo de contato (80 – 95°, Tabela 4).

Além da hidrofobicidade, a adesão celular pode ter sido prejudicada pelo fato dos filmes de gelatina/caseína reticulados apresentarem uma superfície não homogênea devido a presença do derivado de uréia formado no processo de reticulação. As células L929 utilizadas neste trabalho constituem uma linhagem celular de fibroblastos obtida de camundongos, cuja função principal é a constituição do tecido conjuntivo e os principais produtores de colágeno.²⁴³ Estas células são altamente sensíveis às alterações na morfologia da superfície, influenciando dessa forma a proliferação celular.²⁴⁴

4. Estudo de misturas de polímeros em solução

4.1. Gelatina e caseína

Medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) são frequentemente utilizadas para monitorar a formação de complexos poliméricos com base na alteração do valor do raio hidrodinâmico ocasionado pela interpenetração e agregação das cadeias.²⁴⁵ Os valores de raio hidrodinâmico (R_H) obtidos para as proteínas em solução aquosa a diversas concentrações (0,05 - 4,00 mg mL⁻¹) a 20 °C estão apresentados na Tabela 15. O coeficiente de difusão (dados não apresentados) foi obtido com base na relação entre q^2 (vetor intensidade de espalhamento) e Γ (frequência de relaxação) das partículas (Eq. 23). Os valores de R_H discutidos na sequência foram obtidos através da Equação de Stokes-Einstein (Eq. 22) aplicada a distribuição do tempo de relaxação obtidos para os ângulos de 20 a 150°. Devido a diluição, a solução de gelatina na concentração 0,05 mg mL⁻¹ apresentou espalhamento de luz com baixa intensidade impossibilitando a determinação do valor de R_H .

Através das medidas de espalhamento de luz dinâmico foi verificada a existência de dois modos difusivos (rápido e lento) para todas as soluções de gelatina, sendo a principal contribuição proveniente do modo lento. De acordo com a literatura, a distribuição obtida no modo rápido é atribuída à difusão cooperativa relacionada ao movimento de alguns segmentos da cadeia da gelatina enquanto o modo lento representa o movimento do polímero como um todo.²⁴⁶ Os valores de R_H obtidos para as soluções desta proteína foram na faixa de 10 a 94 nm e de 109 a 713 nm referentes ao modo difusivo rápido e lento, respectivamente. Ambos os modos apresentaram uma diminuição nos valores de R_H com o aumento da concentração de gelatina, atingindo um mínimo na concentração de 0,75-1,25 mg mL⁻¹ e aumentando na sequência. A gelatina foi solubilizada em meio aquoso sob aquecimento e durante o resfriamento da solução ocorreu a regeneração parcial da estrutura tripla-hélice do colágeno.²⁴⁷ Desta forma, os valores

elevados de R_H observados nas soluções mais concentradas (acima de $2,50 \text{ mg mL}^{-1}$) sugerem a ocorrência de agregação da gelatina durante o processo de regeneração da tripla-hélice através de interações intermoleculares específicas²⁴⁸ tais como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

Tabela 15. Valores de raio hidrodinâmico obtidos para soluções de gelatina e caseína.

Proteína (mg mL^{-1})	R_H (nm)	
	Gelatina	Caseína
0,05	-	110
0,25	47 / 307	112
0,50	14 / 210	19 / 118
0,75	11 / 109	16 / 125
1,25	10 / 130	15 / 129
2,50	59 / 713	11 / 121
4,00	94 / 713	121

Dependendo da concentração em solução, a caseína apresentou função de distribuição do tipo mono ou bimodal, neste caso com principal contribuição proveniente do modo difusivo lento. As partículas menores apresentaram valores de R_H na faixa de 11 a 19 nm e são representadas pelos monômeros ou sub-micelas de caseína. Por outro lado, as partículas maiores apresentaram valores de R_H na faixa de 110 a 129 nm e caracterizam as micelas de caseína. Estes valores de R_H estão de acordo com a literatura, cujos R_H relatados foram de 12 e 120 nm para os modos difusivos rápido e lento, respectivamente.²⁴⁹

A interação entre gelatina e caseína em solução aquosa a 20°C foi analisada mantendo a concentração de uma proteína constante ($1,25 \text{ mg mL}^{-1}$) e variando a concentração do outro componente ($0,05 - 4,00 \text{ mg mL}^{-1}$). Os valores de R_H obtidos para as misturas estão apresentados na Tabela 16 e os modos de relaxação estão ilustrados na Figura 24. É importante a caracterização de proteínas alimentares em condições onde aglomerados são formados, pois os mesmos influenciam as propriedades reológicas do produto final.

Tabela 16. Valores de raio hidrodinâmico obtidos para misturas de gelatina e caseína.

Composição da mistura (mg mL ⁻¹ /mg mL ⁻¹)	R _H (nm)	
	Gelatina/caseína	Caseína/gelatina
1,25/0	10 / 130	15 / 129
1,25/0,05	8 / 129	10 / 117
1,25/0,25	9 / 170	15 / 129
1,25/0,50	16 / 162	14 / 127
1,25/0,75	23 / 154	10 / 117
1,25/1,25	21 / 128	21 / 128
1,25/2,50	15 / 121	12 / 233
1,25/4,00	22 / 116	66 / 407

As medidas de DLS revelaram a existência de dois modos de relaxação para as misturas formadas por gelatina e caseína. As misturas contendo gelatina na concentração de 1,25 mg mL⁻¹ apresentaram valores de R_H relacionados ao modo rápido na faixa de 8 – 23 nm. Estes valores foram, no geral, intermediários ou superiores aos obtidos para as proteínas puras. Por outro lado, medidas realizadas mantendo a concentração de caseína constante (1,25 mg mL⁻¹) revelaram valores de R_H referente ao menor tempo de relaxação (faixa 10 – 66 nm) menores ou intermediários aos obtidos para as proteínas puras. A intensidade A (t) relacionada a este modo foi pequena e diminuiu com a adição de caseína, conseqüentemente as interações entre as proteínas serão discutidas em relação ao principal modo de distribuição (lento).

No principal modo de distribuição, os valores de R_H obtidos para as misturas contendo gelatina na concentração 1,25 mg mL⁻¹ foram intermediários ou menores que os obtidos para as proteínas puras (Tabela 16) quando a concentração de caseína na mistura foi 0,05 ou acima de 1,25 mg mL⁻¹. Resultado similar foi apresentado pelas misturas quando a concentração de caseína foi mantida em 1,25 mg mL⁻¹. De acordo com a literatura,⁹⁰ não ocorre complexação se o pico de espalhamento de luz da mistura polimérica é largo e localizado entre os picos obtidos para os polímeros puros. O perfil dos complexos formados por gelatina e caseína é dependente do sinal da rede de cargas de ambas as moléculas. Desta forma, para ocorrer interação entre as proteínas seria necessário que ambas apresentassem cargas opostas para a formação de associação polar. Neste trabalho foram utilizados dois polímeros negativamente carregados (pH > pI), o que a princípio impossibilitaria a ocorrência deste tipo de associação entre as proteínas. Além disso, o fato do pH > pI não permite que ocorra coacervação entre os polímeros analisados.

De acordo com a literatura, soluções formadas por gelatina/caseína positivamente carregadas não apresentaram interações específicas quando a razão entre estes polímeros foi na faixa de 0,02 a 0,63.⁹¹

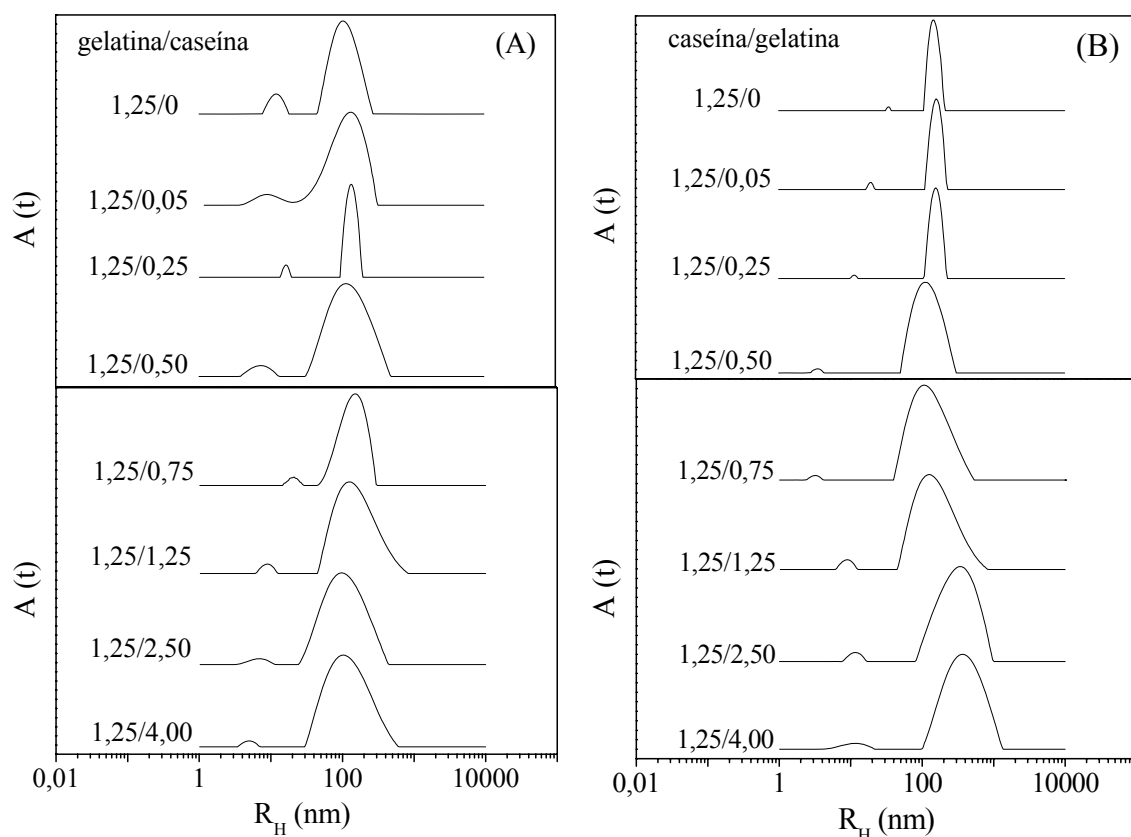


Figura 24. Distribuição dos modos de relaxação $A(t)$ obtidos no ângulo de 90° a 20°C : (A) concentração de gelatina mantida a $1,25\text{ mg mL}^{-1}$ e (B) concentração de caseína mantida a $1,25\text{ mg mL}^{-1}$.

De maneira semelhante, uma interação coulômbica fraca poderia ser atribuída às proteínas desde que os pHs da solução fossem iguais ou próximo ao valor do pI da proteína, de forma que forças de repulsão eletrostática fossem minimizadas entre grupos similarmente carregados.⁹⁴ Estas interações, porém, não podem ser aplicadas em nosso estudo uma vez que o pH utilizado (9) foi bem superior aos pI das proteínas (em torno de 5 para a gelatina e 4,6 para a caseína).

Apesar de ser esperada uma repulsão eletrostática entre as proteínas negativamente carregadas, algumas misturas entre gelatina e caseína ($1,25$ e $0,25 - 0,75\text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente) apresentaram valores de R_H superiores aos das proteínas puras, sugerindo interação parcial entre os polímeros.⁹⁰ Alguns aminoácidos presentes em ambas as proteínas (alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptofano, tirosina e valina) podem levar

as cadeias à associação hidrofóbica. A caseína utilizada neste trabalho é composta por 5 - 8 % de fosfato de cálcio coloidal, que é constituído por cálcio, magnésio, fosfato e citrato. A presença de cálcio e magnésio como contra-íon da caseína pode ter levado a um efeito de blindagem das cargas negativas das proteínas, diminuindo (ou neutralizando) o efeito de repulsão. Este perfil não foi observado para outras misturas provavelmente devido a mudanças na conformação da gelatina, o que teria impedido o acesso à parte de seus grupos funcionais. Em adição, a gelatina e a caseína também apresentam interação via ligação de hidrogênio.⁹³

4.2. Copolímeros

Soluções aquosas dos copolímeros listados na Tabela 17 foram analisadas através de medidas de DLS com o objetivo de verificar a dependência do raio hidrodinâmico destes materiais em função da concentração e da temperatura.

A Figura 25 apresenta a intensidade de luz espalhada obtida a 90° em função da temperatura para as soluções aquosas do copolímero C2 nas concentrações de 0,25 e 1,30 mg mL⁻¹. Uma tendência de variação de intensidade de espalhamento em função da temperatura foi observada para as duas concentrações. De acordo com um estudo prévio,⁵³ o copolímero apresentou transição de fase com o aumento da temperatura devido a associação das cadeias hidrofóbicas do NIPAM. Os mesmos autores afirmaram que um gel pode ser obtido a 37 °C em soluções semi-concentradas (isto é, acima de 6,5 – 8,3 % (% m/v), dependendo da composição do copolímero). A presença dos grupos hidrofílico (amida) e hidrofóbico (isopropila) na cadeia de NIPAM cumpre um papel importante na termosensitividade deste copolímero em solução aquosa.²⁵⁰ Da mesma forma, a presença de blocos altamente hidrofílicos (MPC) influencia as propriedades do copolímero: o homopolímero PNIPAM apresenta LCST de 32 °C enquanto a temperatura crítica de gelatinização para C2 reportada por Li e colaboradores foi de 34 - 35 °C.⁵³ Por outro lado, a copolimerização do NIPAM com monômeros mais hidrofóbicos tais como o *n*-metacrilato de butila conduz a um menor valor de LCST em relação ao observado para o homopolímero PNIPAM.²⁵¹ Em nosso estudo, a temperatura crítica de agregação (T_c) obtida para os copolímeros foi de 33,8 °C, concordando com os dados acima mencionados.

Tabela 17. Características dos copolímeros formados por NIPAM-MPC analisados

Sistema	C1	C2	C3	C4
PNIPAM _m -PMPC _n -PNIPAM _m (C1, C2 e C3)	m=81	m=89	m=90	m=79
PNIPAM _m -PMPC _n -S-S-PMPC _n -PNIPAM _m (C4)	n=200	n=250	n=300	n=150

Como ilustrado na Figura 25, a intensidade de espalhamento de luz normalizado I/C (medido no ângulo de espalhamento de 90°) aumentou consideravelmente com o aquecimento das soluções de copolímeros em aproximadamente 33°C . Como mencionado acima, isso se deve a auto-associação das cadeias do copolímero e é explicado pelo fato do PNIPAM se tornar hidrofóbico devido a redução da rede de ligações de hidrogênio com moléculas de água acima da temperatura crítica.⁵⁷

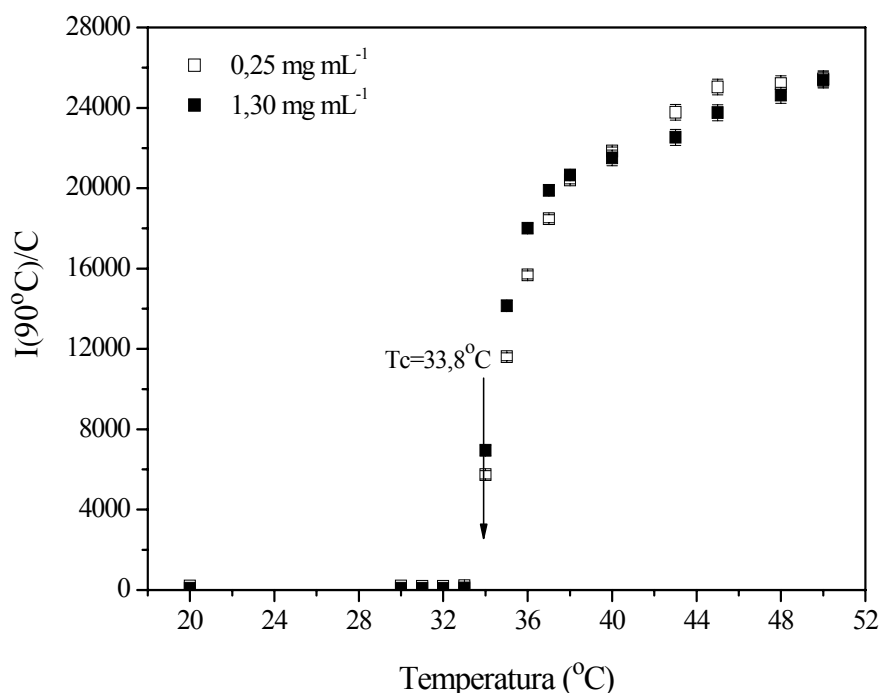


Figura 25. Intensidade de espalhamento de luz normalizado para a concentração I/C em função da temperatura obtida a 90° para o copolímero PNIPAM₈₉-PMPC₂₅₀-PNIPAM₈₉ (C2) em solução aquosa.

O mesmo experimento foi conduzido utilizando um intervalo de tempo constante de 25 min entre cada temperatura medida. A curva A (Figura 26) foi similar à observada na Figura 25. Entretanto, diferenças significativas ocorreram quando o experimento foi realizado em três temperaturas (curva B, Figura 26) utilizando um intervalo de tempo constante de 25 min. Neste caso, a intensidade a 20°C foi similar à observada nas Figuras 25 e 26A. Entretanto, as intensidades de luz espalhada obtidas a 35°C e 50°C foram diferentes para as curvas A e B. Esta diferença se deve ao fato dos dados obtidos na Figura 26A terem sido medidos após 100 min e os dados da Figura 26B após 25 min. Ocorreu uma cinética de equilíbrio termodinâmico e acreditamos que a estrutura organizada acima da LCST esteja “congelada” e que a intensidade de espalhamento permaneça constante.

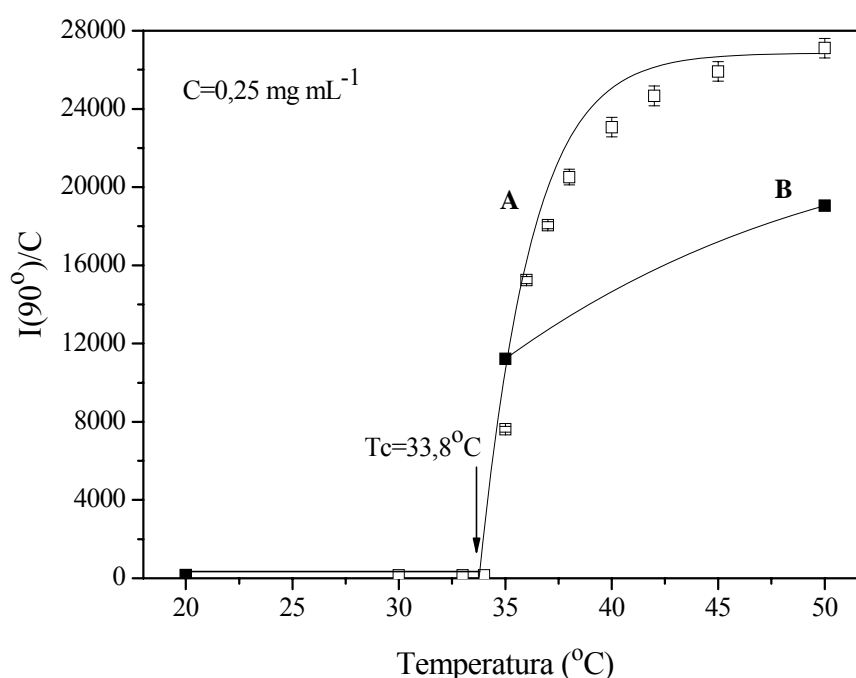


Figura 26. Intensidade de espalhamento de luz normalizado de uma solução aquosa $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ de PNIPAM₈₉-PMPC₂₅₀-PNIPAM₈₉ (C2) obtida a 90° . Um tempo de equilíbrio de 25 min foi utilizado em cada intervalo de temperatura.

Experimentos foram realizados em função do tempo para confirmar que o sistema está “congelado” nas temperaturas de 35°C , 40°C e 50°C , que estão acima da LCST. Dados de intensidade de espalhamento em função do tempo obtidos nestas temperaturas estão apresentados na Figura 27. O equilíbrio foi atingido e ilustrado por um valor constante de intensidade após 25 min. Foi observado que $I(50^\circ\text{C}) < I(40^\circ\text{C}) < I(35^\circ\text{C})$. Esta diferença em intensidades pode ser explicada pelo fato de o sistema ter sido mantido o mesmo período de tempo (25 min) para atingir as temperaturas mais elevadas. Sob tais circunstâncias, o processo de agregação/auto associação (ou a intensidade) foi “congelado” mais rapidamente a maiores temperaturas.

As Figuras 28 a 31 resumam os vários experimentos de espalhamento de luz dinâmico realizados com a finalidade de medir os tempos de relaxação dos copolímeros tribloco à várias concentrações e temperaturas abaixo e acima da LCST do PNIPAM.

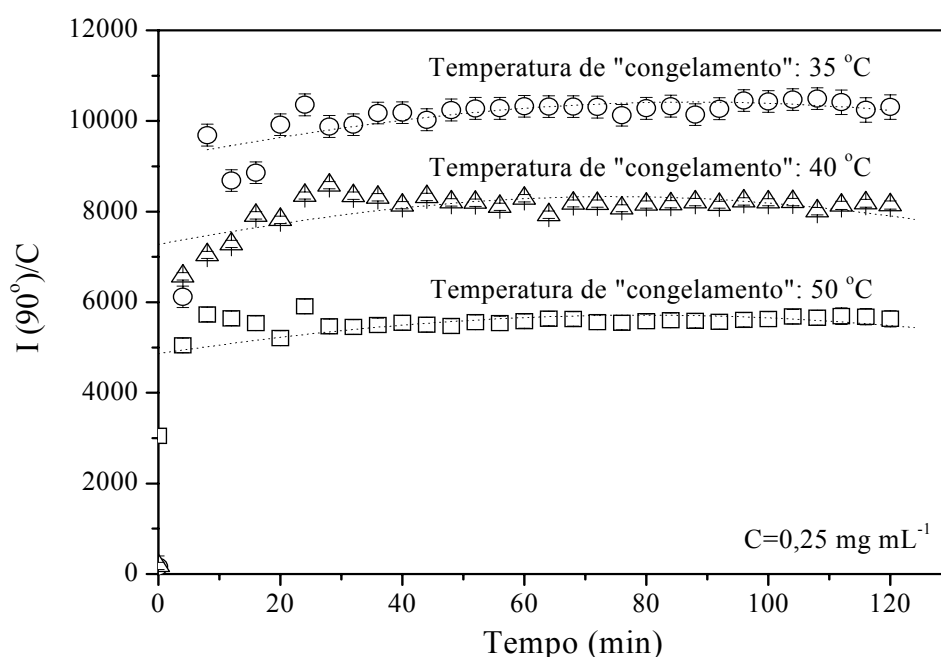


Figura 27. Intensidade de espalhamento de luz normalizado de uma solução aquosa $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ de PNIPAM₈₉-PMPC₂₅₀-PNIPAM₈₉ (C2) obtida a 90° nas temperaturas de 35, 40 ou 50°C .

Funções de autocorrelação $C(q,t)$ e distribuições do tempo de relaxação $A(t)$, ambos obtidos a 20°C e 40°C para soluções de copolímero $2,50 \text{ mg mL}^{-1}$, estão apresentados na Figura 28. Estreitas distribuições para os tempos de relaxação foram obtidas para os copolímeros tribloco em temperaturas elevadas (40°C), sugerindo que as partículas presentes no seio da solução são monodispersas. Entretanto, uma distribuição bimodal foi obtida a diversos ângulos de espalhamento para os copolímeros a 20°C . Nesta temperatura, o sistema não é homogêneo abaixo de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ (presença de agregados). Acima de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ foram observadas partículas com distribuição relativamente monodispersa. Por outro lado, para toda a faixa de concentração investigada a uma temperatura elevada ($> \text{LCST}$), os sistemas apresentaram auto-associação para formar nanopartículas cujo tamanho aumentou com a concentração.

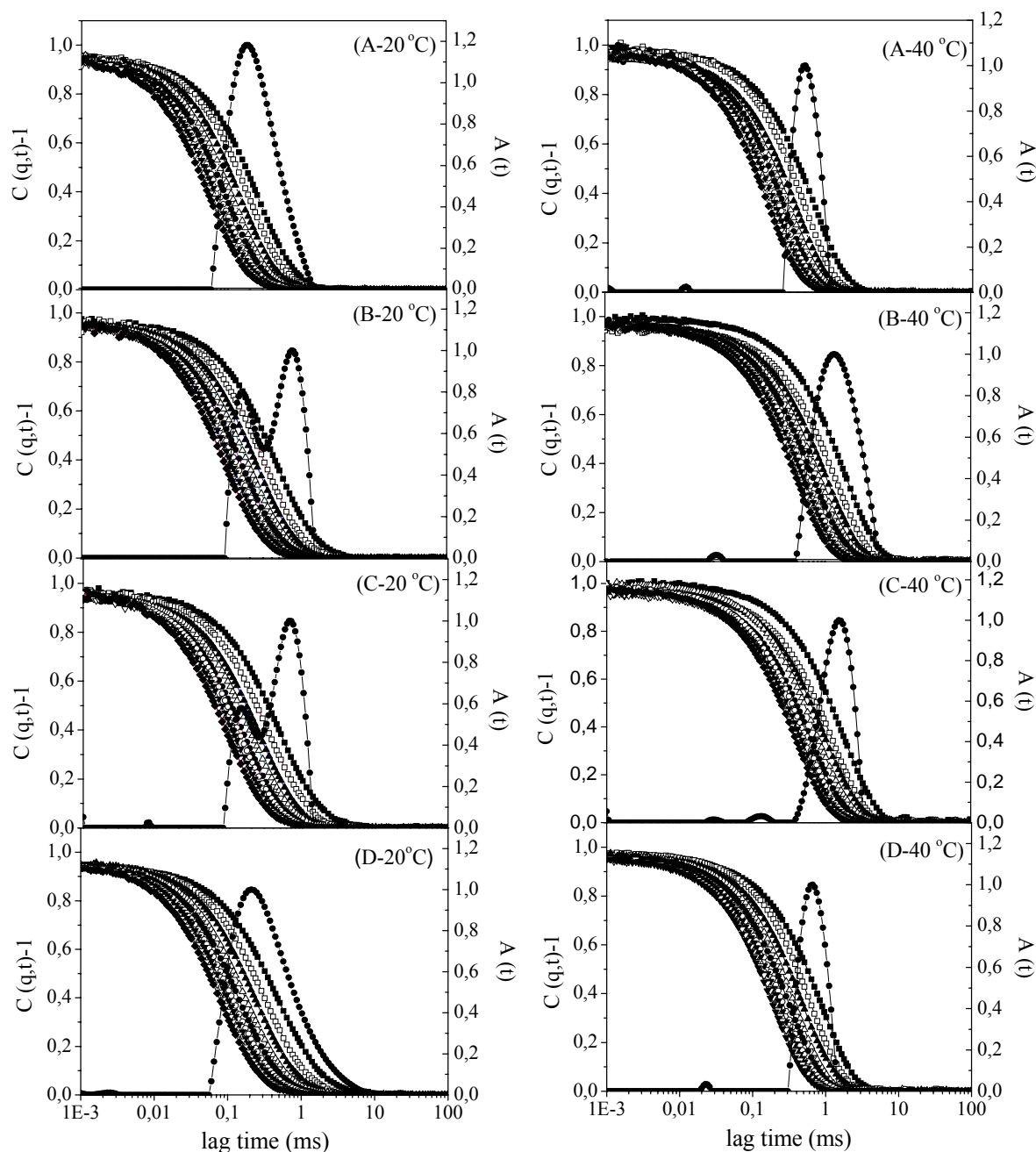


Figura 28. Funções de autocorrelação $C(q,t)$ obtidas nos ângulos de $50 - 130^\circ$ e distribuição dos tempos de relaxação $A(t)$ a 90° para soluções de copolímero $2,50 \text{ mg mL}^{-1}$ (A) C1, (B) C2, (C) C3 e (D) C4 a 20 e a 40°C .

A variação da frequência de relaxação (Γ) em função de q^2 obtidos a 20 e a 40°C está ilustrada na Figura 29. Os valores de D foram significativamente maiores a 20°C , indicando valores menores de R_H nesta temperatura para cada solução de copolímero na concentração de $2,50 \text{ mg mL}^{-1}$.

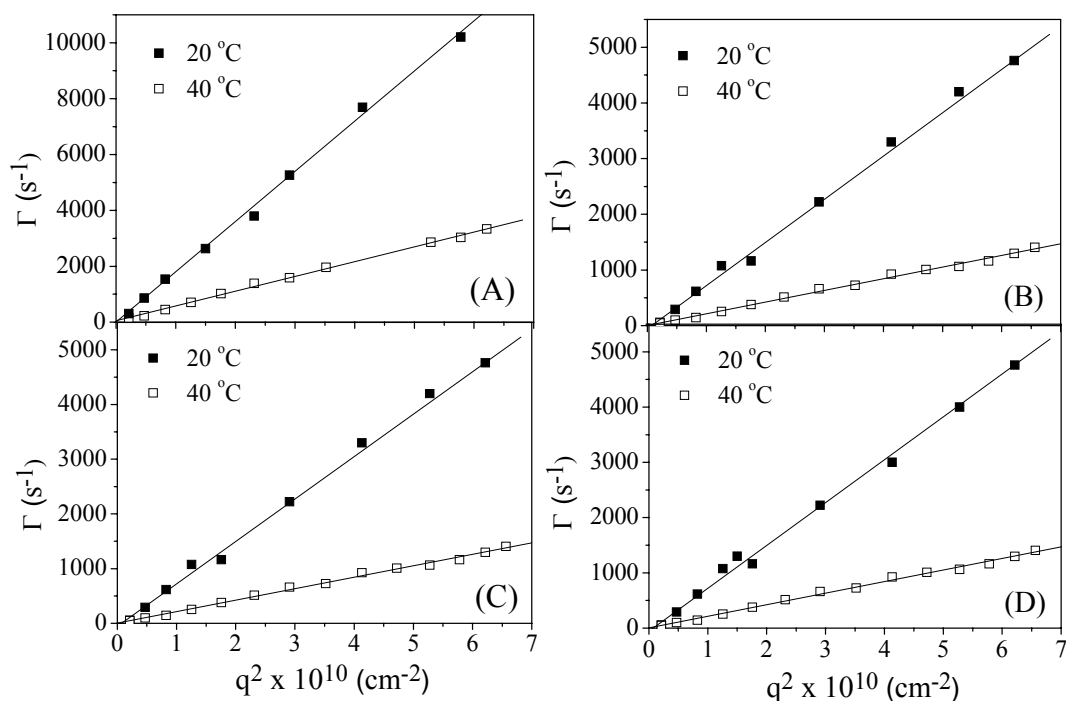


Figura 29. Variação da frequência de relaxação em função de q^2 para uma solução aquosa de copolímero a $2,50 \text{ mg mL}^{-1}$ analisada a 20 e a 40 °C: (A) C1, (B) C2, (C) C3 e (D) C4.

A Figura 30 apresenta os valores de R_H e os modos de relaxação obtidos para o copolímero C2 em várias concentrações analisadas a 20 e a 40 °C. A 20 °C, os valores de R_H foram praticamente constantes na faixa de $0,50$ a $4,00 \text{ mg mL}^{-1}$ e aumentaram em soluções mais diluídas ($0,05 - 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) devido à formação de agregados. Entretanto, medidas realizadas a 40 °C mostraram formação de micelas cujo tamanho aumentou em função do aumento da concentração da solução do copolímero. Comportamento semelhante foi observado para os demais copolímeros, desta forma para estes sistemas serão apresentados apenas os valores de R_H obtidos a 40 °C e no principal modo de distribuição analisado a 20 °C (modo difusivo lento).

De acordo com a Figura 31, os valores de R_H obtidos para os copolímeros C2 e C3 a 20 °C foram semelhantes ($\sim 27 \text{ nm}$) na faixa de concentração de $0,50 - 4,00 \text{ mg mL}^{-1}$, provavelmente devido aos tamanhos próximos das cadeias poliméricas. Por outro lado e como mencionado acima, para as soluções de copolímero mais diluídas, o sistema não está em equilíbrio termodinâmico e houve formação de grandes agregados. Nesta mesma temperatura, os valores de R_H encontrados para os copolímeros C1 e C4 foram de ~ 15 e 22 nm , respectivamente, apresentando pouca dependência da concentração na faixa de $0,25$ a $4,00 \text{ mg mL}^{-1}$.

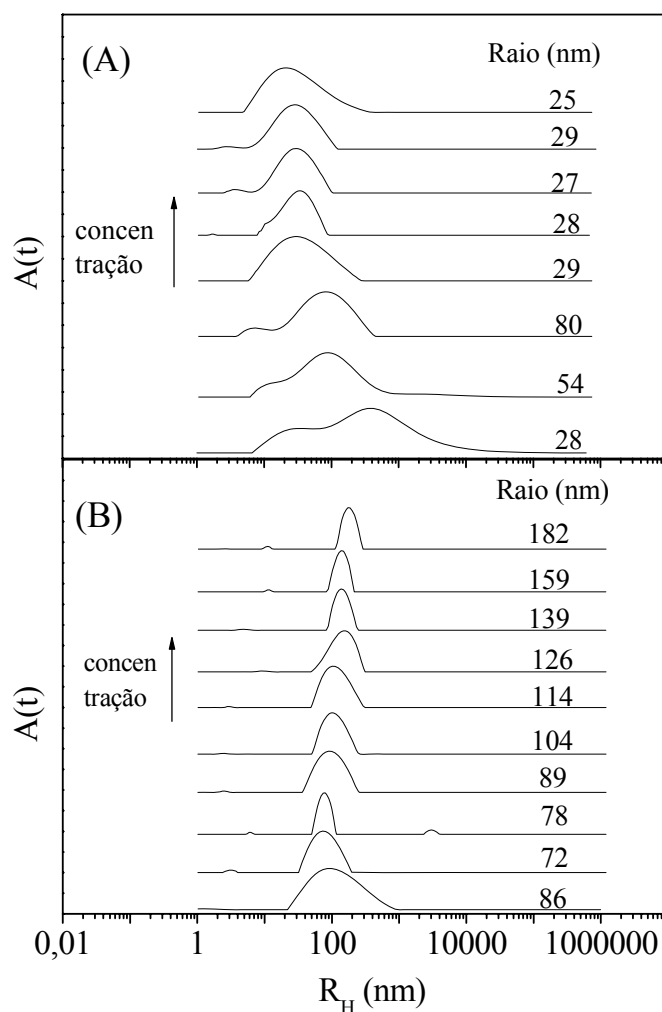


Figura 30. Relação entre a função de autocorrelação $A(t)$ e os raios hidrodinâmicos obtidos para PNIPAM₈₉-PMPC₂₅₀-PNIPAM₈₉ (C2) nas concentrações de: (A) 4,00 – 0,05 mg mL⁻¹ a 20 °C e (B) 4,00 – 0,01 mg mL⁻¹ a 40 °C.

Medidas realizadas a 40 °C mostraram uma dependência entre a concentração da solução e o tamanho das micelas. Comportamento similar foi apresentado pelos copolímeros C2 e C3, com valores de R_H na faixa de 65 a 182 nm. Os copolímeros C1 e C4 apresentaram valores de raio hidrodinâmico na faixa de 52 – 120 nm e 53 – 85 nm, respectivamente. Apenas um modo de relaxação foi observado para cada solução de copolímero nesta temperatura. Estas nanopartículas, observadas a diferentes concentrações e temperaturas, são estabilizadas pelos blocos de PMPC enquanto seu centro é principalmente constituído por PNIPAM mesmo a baixas temperaturas (20 °C).

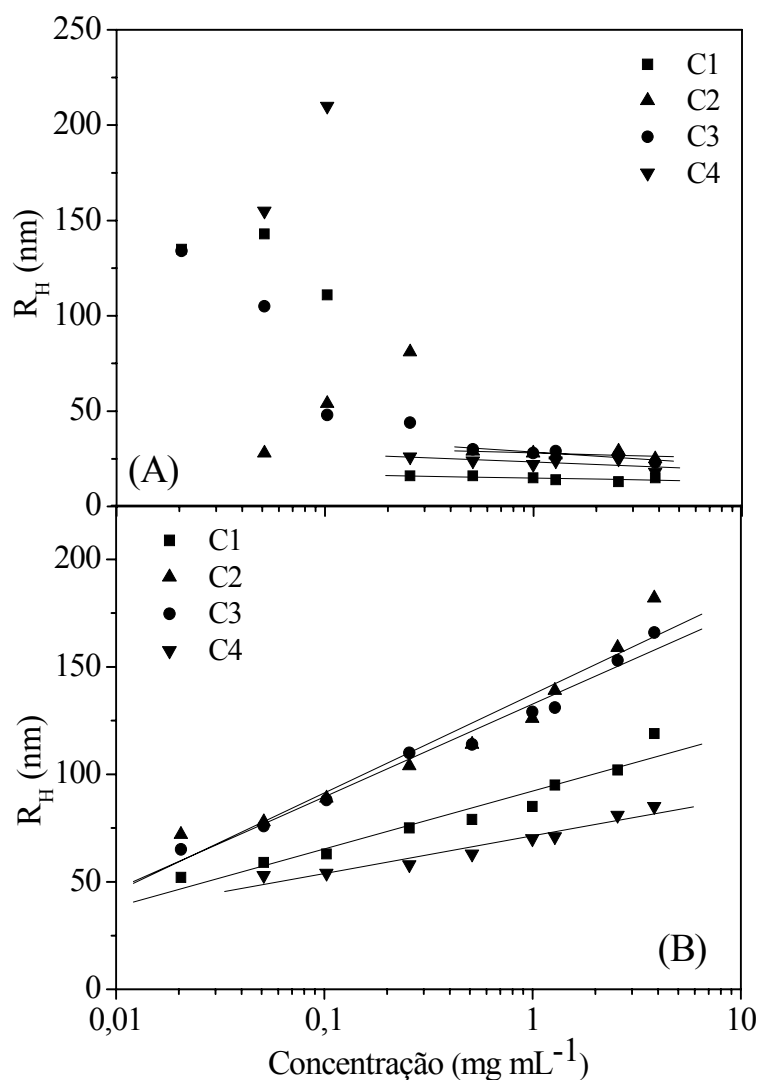


Figura 31. Valores de raio hidrodinâmico em função da concentração da solução de copolímero: (A) 20°C e (B) 40°C.

O tamanho das micelas formadas pelos quatro copolímeros ($2,50 \text{ mg mL}^{-1}$) foi avaliado a 40 °C em pH 3, 6, 9 e 11 (Figura 32). Os resultados mostraram que o aumento do pH da solução de copolímero diminuiu o tamanho das micelas. O polímero C1 apresentou R_H de 113 nm a pH 3, diminuindo para 93 quando analisado em pH 11. Maior agregação foi observada para os polímeros C2 e C3, que apresentaram valores similares de R_H em pH 3 (169 e 156 nm, respectivamente), diminuindo para 137 e 125 nm, respectivamente, em pH 11. O copolímero C4 apresentou redução do R_H de 80 para 71 nm nos pH de 3 e 11, respectivamente.

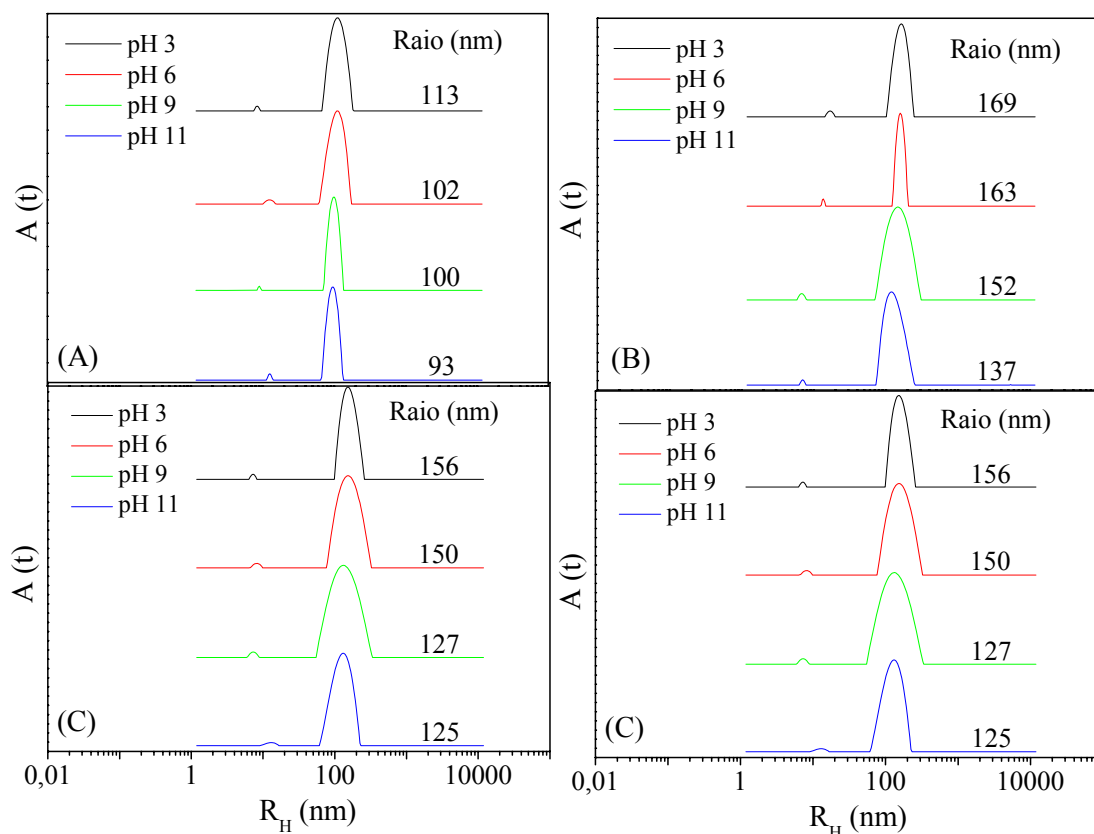


Figura 32. Distribuição dos modos de relaxação $A(t)$ a 90° e 40°C em diferentes pH: (A) C1, (B) C2, (C) C3 e (D) C4.

De acordo com a literatura, partículas contendo NIPAM são sensíveis ao pH se copolimerizadas com grupos ácidos ou básicos. As variações de pH resultariam na ionização destes grupos e alterariam o tamanho da partícula.²⁵² Por outro lado, uma solução formada por um polímero zwitteriônico pode apresentar, dependendo do pH, atração eletrostática levando à associação inter e intramolecular ou repulsão eletrostática, que conduz à solvatação das cadeias poliméricas. Desta forma, a redução do tamanho das micelas com o aumento do pH está relacionada à parte zwitteriônica do polímero representado pelo MPC. A adição de NaOH aumentou a força iônica do meio, diminuindo a repulsão eletrostática dos grupos fosfatos do copolímero e, conseqüentemente, reduzindo o tamanho das micelas via associação intercadeia. Resultado semelhante foi observado para o polímero zwitteriônico poli(*N,N*-dimetil ((metacrilamido) propil) propiolactona de amônio).²⁵³ O aumento da força iônica pode também ter diminuído a solvatação das partículas, tornando as cadeias poliméricas mais hidrofóbicas e resultando na agregação intercadeia.²⁵⁴ Este resultado pode estar associado ao cloreto, pois em geral, quanto mais fracamente hidratado o contra-íon, maiores são as micelas pelo fato do íon ser adsorvido mais facilmente na superfície micelar, diminuindo a repulsão de carga entre os grupos

polares.²⁵⁵ Além disso, o aumento de tamanho das micelas com a redução do pH pode estar associado ao intumescimento ou leve agregação com redução das interações entre os copolímeros e o solvente.²⁵³

Medidas de DSC baseadas na variação da capacidade calorífica à pressão constante (C_p) foram realizadas apenas para os copolímeros C1 e C4 em solução aquosa, pois os valores de temperatura de turvação (T_c) obtidos foram similares aos determinados através de DLS (33,8 °C). A T_c (Tabela 18) foi obtida através da intersecção da linha base e da porção linear do pico do termograma.

Tabela 18. Valores de T_c e de T_g obtidos para os copolímeros via DSC.

Copolímero	T_c (°C) ^a	T_g (°C)
C1	32,3	61,1
C2	NR	140,0
C3	NR	-
C4	30,6	61,5 e 137,8

^aNR: medida não realizada

Medidas de DSC revelaram a presença de duas T_g 's para a amostra C4, indicando que este copolímero apresenta os homopolímeros dispostos em blocos. De acordo com a literatura, o PNIPAM apresenta T_g em 134°C,²⁵⁶ similar aos 137,8 °C encontrados para o C4. O outro valor de T_g apresentado por este polímero (61,5 °C) é referente a contribuição das cadeias de MPC. Os demais polímeros analisados (C1, C2 e C3) apresentaram apenas uma ou nenhuma T_g . A ausência das demais T_g 's pode estar associada a pequena variação de energia ocorrida durante a transição.

A morfologia e o tamanho dos agregados de copolímeros foram avaliados via MET a 20 e a 40 °C (Figura 33). Os maiores agregados micelares foram observados a 40 °C e estão de acordo com as medidas de DLS. O diâmetro médio para os copolímeros C1 e C3 variaram de ~ 75 a ~ 85 nm quando a temperatura aumentou de 20 para 40 °C (Tabela 19). Os agregados formados pelo copolímero C4 também apresentaram um pequeno aumento de tamanho (de 83 para 88 nm) com o aquecimento. Por outro lado, foi observada uma considerável variação no tamanho do copolímero C2 (de 108 para 633 nm) com o aumento da temperatura, aparentemente contradizendo as medidas de DLS.

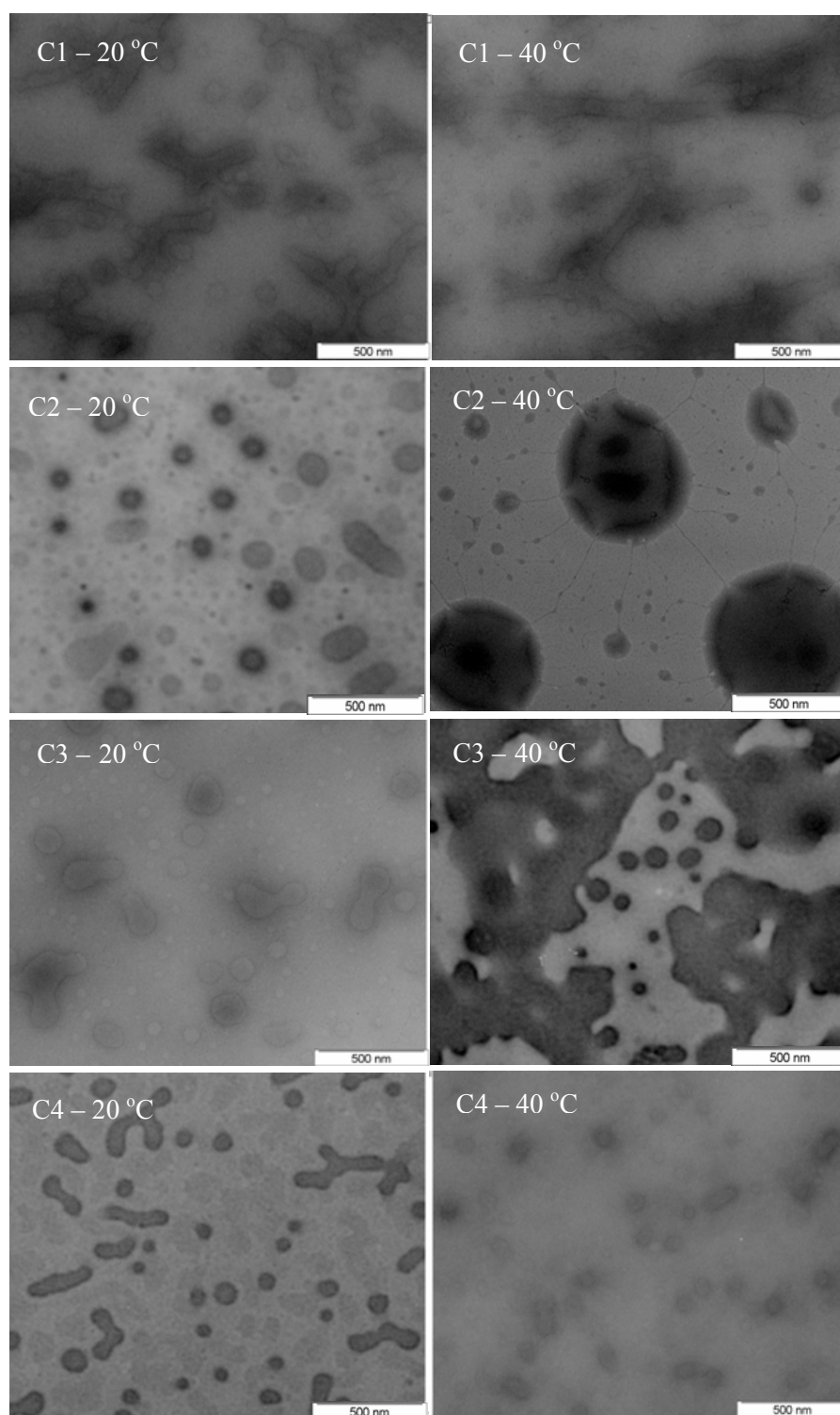


Figura 33. Microscopia eletrônica de transmissão obtida para os copolímeros a 20 °C e 40 °C.

Tabela 19. Diâmetros médios obtidos para os copolímeros através de MET.

Copolímero	20 °C	40 °C
C1	73 ± 14	81 ± 13
C2	108 ± 24	633 ± 85
C3	76 ± 34	90 ± 22
C4	83 ± 19	88 ± 12

A 40 °C os copolímeros apresentaram agregados de diferentes formas e, em alguns casos, houve evidência de formação de redes. Os diâmetros das partículas obtidos por MET a 40 °C foram menores que os determinados por DLS, como esperado. Em medidas de DLS, o diâmetro das partículas é obtido baseado na intensidade média de luz espalhada, enquanto MET reporta estes valores baseado no número médio. Desta forma, para distribuição de tamanho finito, partículas analisadas por DLS serão sempre maiores que as determinadas por MET. Além disso, medidas de DLS foram realizadas em solução, logo os copolímeros estavam hidratados e intumescidos enquanto as medidas de MET foram realizadas com as amostras secas e sob condições de ultra-vácuo. Os maiores agregados observados por MET a 20 °C em relação aos obtidos por DLS sugerem a ocorrência de coalescência entre as partículas durante a preparação das amostras para a análise microscópica.

Medidas de fluorescência do pireno foram conduzidas com o objetivo de determinar a concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros. O pireno influencia as intensidades relativas das bandas de emissão em 372 nm (I_1) e 384 nm (I_3), e desta forma a razão I_1/I_3 pode ser utilizada para determinar a CMC.²⁵⁷

A razão I_1/I_3 foi calculada para os 4 copolímeros a 40 °C e para o C1 a 20 °C e o resultado está apresentado na Figura 34. Como esperado, não foi observado formação de micelas a 20 °C para o copolímero C1, concordando com as medidas de DLS. Desta forma, esta análise não foi realizada para os demais copolímeros a 20 °C, uma vez que um comportamento similar seria esperado. Por outro lado, os polímeros C1, C2 e C3 apresentaram inflexões na faixa de concentração de 0,030 - 0,037 mg mL⁻¹, enquanto o copolímero C4 apresentou CMC em 0,11 mg mL⁻¹, indicando a formação de micelas a 40 °C. Estes resultados estão de acordo com as medidas de DLS e MET, confirmando agregação micelar nas temperaturas acima de 32 °C. Através deste mesmo método de fluorescência, Giacomelli e colaboradores⁶⁴ obtiveram valores de CMC de 0,025 e 0,014 mg mL⁻¹ para os copolímeros dibloco PMPC₃₀-*b*-PDPA₃₀ e PMPC₃₀-*b*-

PDPA₆₀. Similarmente, Camas e colaboradores²⁵⁸ obtiveram CMC de $\sim 10^{-3}$ mg mL⁻¹ para o copolímero PNIPAM-*b*-poliestireno.

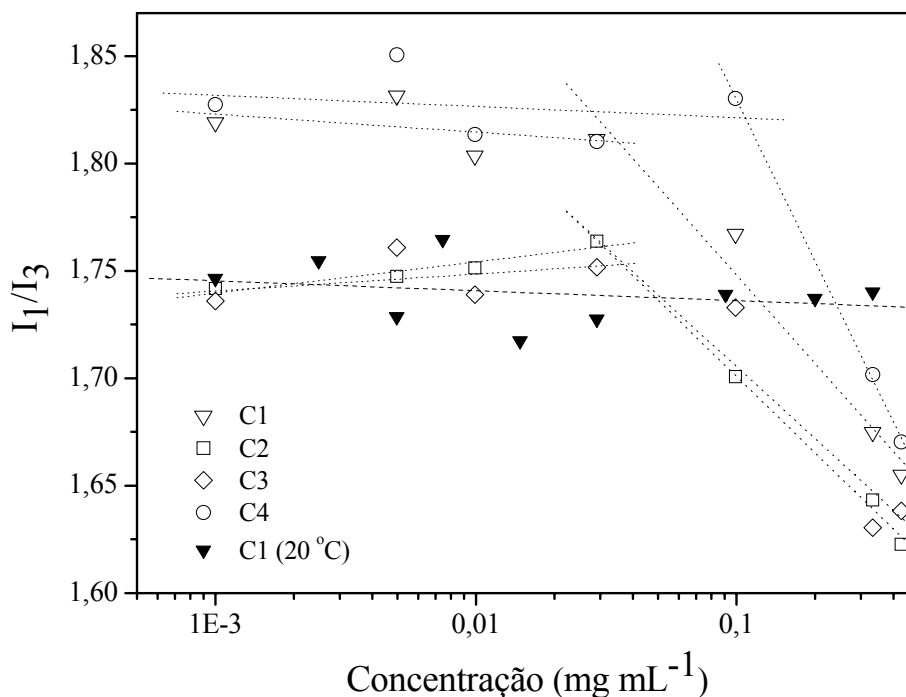


Figura 34. Razão da intensidade I_3/I_1 obtida a partir do espectro de emissão do pireno para todos os copolímeros a 40 °C e para o copolímero C1 a 20 °C.

4.3. Proteínas e copolímeros

Medidas de DLS foram realizadas para avaliar interações entre as proteínas gelatina ou caseína e os copolímeros PNIPAM₈₁-PMPC₂₀₀-PNIPAM₈₁ (C1), PNIPAM₈₉-PMPC₂₅₀-PNIPAM₈₉ (C2), PNIPAM₉₀-PMPC₃₀₀-PNIPAM₉₀ (C3) e PNIPAM₇₉-PMPC₁₅₀-S-S-PMPC₁₅₀-PNIPAM₇₉ (C4). Inicialmente foi determinado o tempo necessário para que o R_H da mistura proteína/copolímero permanecesse constante. A Figura 35A apresenta os modos de distribuição obtidos a 90° para misturas de gelatina/C2 na concentração 1,25/1,25 mg mL⁻¹ analisados a 20 °C. Os valores de R_H obtidos para a mistura foram semelhantes nas análises realizadas entre 1 e 8 h e os modos de distribuição apresentaram alargamento após 5 h. Teste análogo foi realizado para diferentes composições de gelatina/copolímero, obtendo-se sempre valores de R_H semelhantes nas medidas realizadas entre 1 e 5 h após a mistura. Este experimento também foi realizado para algumas misturas formadas por gelatina/copolímero a 40 °C, as quais apresentaram modo de distribuição monomodal (resultados não apresentados) e valores constantes de R_H nas medidas realizadas entre 0,5 e 5 h. Desta forma optou-se por fazer medidas

de espalhamento de luz dinâmico das soluções de gelatina/copolímero após 4 h quando a temperatura utilizada era de 20 °C e 2 h para a temperatura de 40 °C.

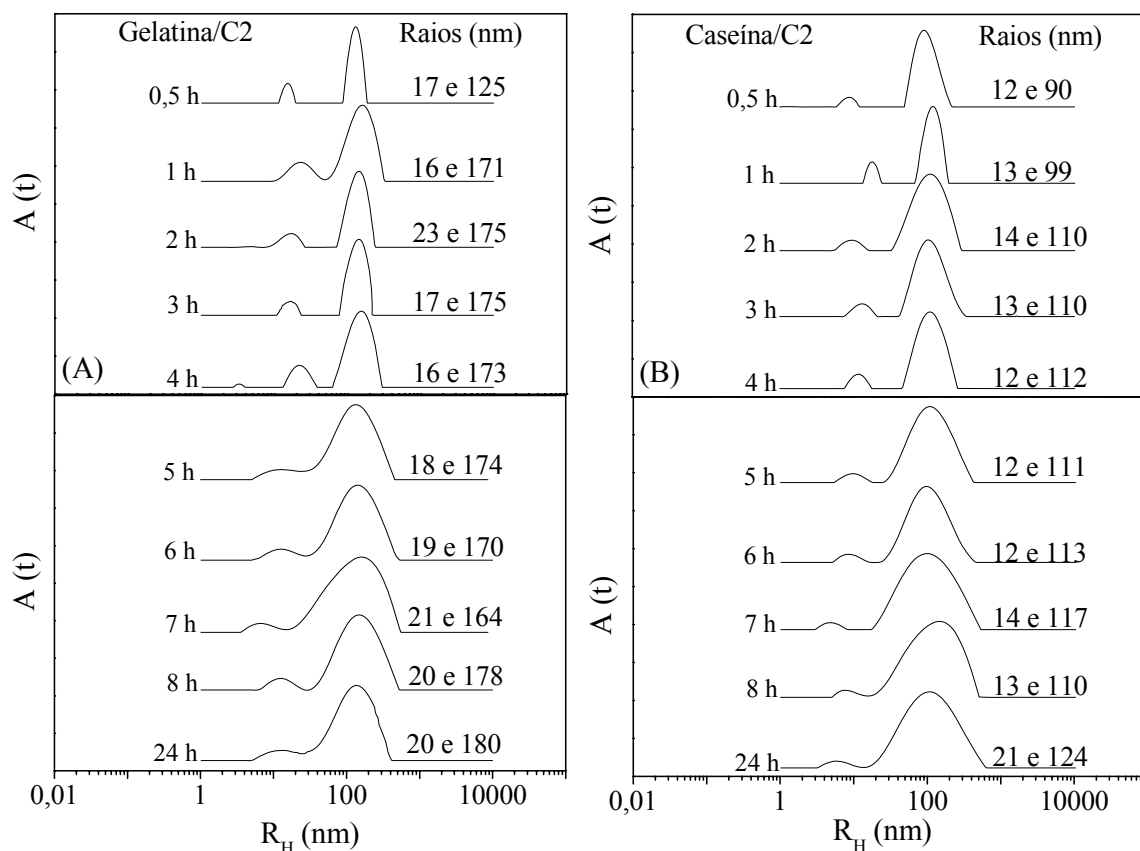


Figura 35. Modos de distribuição obtidos a 90° para soluções de (A) gelatina/C2 e (B) caseína/C2, ambos na concentração de 1,25 mg mL⁻¹/1,25 mg mL⁻¹ obtidos a 20 °C em função da variação do tempo de mistura.

A Figura 35B apresenta os modos de distribuição obtidos a 90° e analisados a 20 °C para misturas de caseína/C2 na concentração 1,25/1,25 mg mL⁻¹. Os valores de R_H obtidos para esta composição foram semelhantes nas análises realizadas entre 2 e 8 h após a mistura. Por outro lado, diferentes combinações de caseína/copolímero apresentaram valores de R_H análogos nas medidas realizadas entre 1 e 7 h. Em relação às medidas realizadas a 40 °C foi observada distribuição monomodal (resultados não apresentados) e valores de R_H semelhantes na faixa de 0,5 – 7 h após a mistura. Tendo em vista estes resultados, o tempo de repouso para misturas de caseína/copolímero foi de 3 h para medidas realizadas a 20 °C e de 1,5 h para análises a 40 °C.

4.3.1. Proteínas/PNIPAM_n-PMPC_m-PNIPAM_n

A Tabela 20 apresenta os valores de R_H obtidos para misturas de gelatina/copolímeros (C1, C2 e C3) em solução aquosa a 20 e a 40 °C. Misturas formadas por gelatina (0,50 mg mL⁻¹) e C1 analisadas a 20 °C revelaram a existência de dois modos de relaxação, com principal pico de espalhamento obtido no modo difusivo lento. Os modos de distribuição obtidos para esta mistura foram similares aos apresentados pelo sistema gelatina/C2 (Figura 36A). No modo difusivo rápido (R_H 15 – 28 nm), os valores de R_H das misturas de gelatina (0,50 mg mL⁻¹) e C1 foram, em geral, superiores aos obtidos para os componentes puros, sugerindo interação entre os polímeros provavelmente via ligação de hidrogênio. O pequeno tamanho das partículas parece ter sido fundamental para a ocorrência deste evento. Em relação ao modo difusivo lento, os valores de R_H (155 – 192 nm) foram intermediários aos obtidos para os polímeros puros, sugerindo ausência de interação entre os polímeros e concordando com medidas de DLS realizadas para misturas de gelatina/PNIPAM a 25 °C.⁹⁰ A interação entre a gelatina e o bloco zwitteriônico MPC deve ser pequena, pois, de acordo com a literatura,²⁵⁹ o MPC adsorve pouca proteína em relação aos polímeros hidrofílicos convencionais devido ao elevado conteúdo de água livre presente no polímero hidratado. A quantidade de água absorvida pelos materiais poliméricos influencia a adsorção de proteína sobre sua superfície.²⁶⁰

Misturas contendo gelatina na concentração de 1,25 mg mL⁻¹ e C1 também apresentaram dois modos de distribuição nas análises realizadas a 20 °C. O modo rápido apresentou valores similares de R_H (9 - 17 nm) e em geral intermediários aos obtidos para os polímeros puros, sugerindo ausência de interação entre os componentes. Os perfis de distribuição dos modos de relaxação apresentados por esta mistura foi semelhante aos obtidos para gelatina/C2 (Figura 36B). No modo lento, os valores de R_H (144 - 194 nm) foram maiores que os obtidos para os polímeros puros nesta temperatura. Neste caso seria possível assumir interação via ligação de hidrogênio entre a gelatina e a cadeia de polímero neutro (NIPAM), pois, como mencionado, o MPC interage pouco com proteínas por apresentar elevado conteúdo de água livre.²⁵⁹ Entretanto esperava-se que a interação entre ambos os polímeros seria atribuída, principalmente, ao aumento da hidrofobicidade do NIPAM em temperatura superior a 32 °C.²⁶¹

Tabela 20. Valores de raio hidrodinâmico obtidos para diversas misturas de gelatina/copolímero a 20 e 40 °C.

Gelatina/copolímero (mg mL ⁻¹ / mg mL ⁻¹)	C1		C2		C3	
	20 °C	40 °C	20 °C	40 °C	20 °C	40 °C
0,50/0	14 / 210	12 / 292	14 / 210	12 / 292	14 / 210	12 / 292
0,50/0,05	16 / 177	9 / 82	11 / 170	11 / 119	18 / 152	5 / 102
0,50/0,25	21 / 192	90	11 / 176	147	14 / 155	138
0,50/0,50	28 / 185	99	20 / 120	150	20 / 167	141
0,50/0,75	21 / 163	105	20 / 172	159	18 / 187	153
0,50/1,25	16 / 168	119	15 / 216	184	21 / 170	175
0,50/2,50	17 / 155	117	16 / 218	197	20 / 182	189
0,50/4,00	15 / 188	133	25 / 201	234	22 / 190	232
1,25/0	10 / 130	14	10 / 130	14	10 / 130	14
1,25/0,05	17 / 144	7 / 78	9 / 163	8 / 125	15 / 133	6 / 119
1,25/0,25	14 / 172	97	24 / 176	147	19 / 133	132
1,25/0,50	9 / 169	101	8 / 108	145	19 / 169	145
1,25/0,75	13 / 148	107	11 / 150	161	16 / 164	161
1,25/1,25	15 / 171	113	15 / 173	167	18 / 175	168
1,25/2,50	16 / 158	125	23 / 214	207	18 / 197	198
1,25/4,00	16 / 194	141	23 / 151	219	22 / 283	210

Por outro lado, as medidas de DLS realizadas a 40 °C revelaram a existência de apenas um modo de relaxação para as misturas formadas por gelatina (0,50 mg mL⁻¹) e C1 (Tabela 20 e Figura 36 C). As misturas apresentaram pequenas intensidades de A(t) referentes ao modo rápido que não foram detectadas em todos os ângulos de espalhamento avaliados (20 - 150°). De forma similar às análises realizadas a 20 °C, as misturas contendo gelatina na concentração de 0,50 mg mL⁻¹ apresentaram valores de R_H intermediários aos obtidos para os polímeros puros, indicando ausência de interação entre os mesmos a 40 °C.

Misturas contendo gelatina na concentração de 1,25 mg mL⁻¹ e C1 também apresentaram um modo de distribuição quando analisadas a 40 °C. As misturas apresentaram pequenas intensidades de A(t) referentes ao modo rápido que não foram detectadas em todos os ângulos de espalhamento avaliados. De forma similar às análises realizadas a 20 °C para esta concentração

de gelatina, as misturas apresentaram valores de R_H superiores aos obtidos para os polímeros puros, indicando interação hidrofóbica entre os mesmos (NIPAM apresenta LCST a 33,8 °C) e concordando com a literatura.⁹⁰ À 40 °C as misturas de gelatina/C1 apresentaram aumento de R_H com o aumento da concentração de copolímero na solução.

Os resultados obtidos para as misturas de gelatina/C1 sugeriram que as interações entre os polímeros estão relacionadas com as concentrações de gelatina utilizadas e não com as temperaturas de análise. Como mencionado, e considerando o principal modo de distribuição, ocorreu interação entre os componentes nas misturas de gelatina/C1 apenas quando a concentração da proteína foi de 1,25 mg mL⁻¹ em ambas as temperaturas analisadas (20 e 40 °C). Este resultado deve estar associado aos menores valores de R_H encontrados para a gelatina 1,25 mg mL⁻¹ (em ambas as temperaturas) em relação à gelatina mais diluída, favorecendo a associação efetiva entre os polímeros. De acordo com a literatura,²⁶² o estado da dissolução de polímeros em solução é decisiva para a sua compatibilidade com outros polímeros. A solubilidade atua de duas maneiras sobre a estabilidade: (1) competição assimétrica entre os polímeros de diferentes tipos pelo solvente pode causar separação de fase e (2) formação de cluster que afeta desfavoravelmente a entropia da mistura. Por exemplo, o caso da auto-agregação da gelatina foi sugerida ser a razão de sua incompatibilidade com outros polímeros, tais como maltodextrina e glucana.²⁶³ Análises de misturas de gelatina e dextrana indicaram que a concentração, e não a temperatura, induziram a transição de fase.²⁶⁴ A auto-agregação da gelatina acima de determinada concentração poderia explicar nossos resultados. Tais estruturas teriam uma massa molar efetiva bem superior às das cadeias simples, desta forma a entropia da mistura é reduzida em soluções de gelatina com outro biopolímero quando cadeias desta proteína apresentam mobilidades limitadas devido a sua agregação. Os resultados de DLS apresentados pelas misturas de gelatina e C2 ou C3 (discutidas a seguir) apresentaram perfil de interação semelhante ao observado para o sistema gelatina/C1.

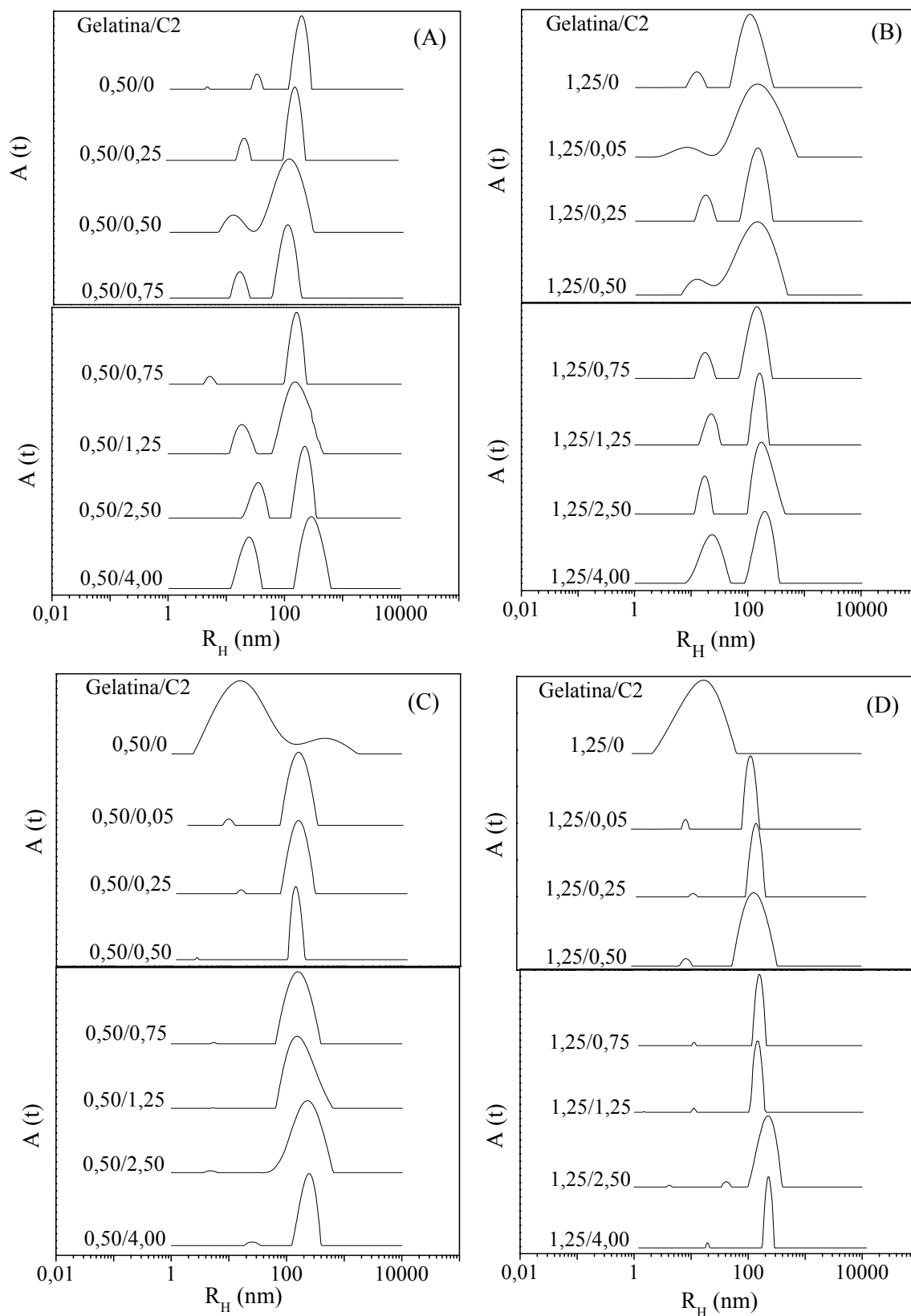


Figura 36. Distribuição dos modos de relaxação $A(t)$ a 90° obtidos para misturas de gelatina/C2 a (A, B) 20 °C e a (C, D) 40 °C.

Análises complementares tais como espalhamento de luz estático e medidas de potencial zeta deveriam ser realizados para um melhor entendimento dos resultados apresentados por estes sistemas, uma vez que pode ter ocorrido, além de interação, (1) repulsão estérica da cadeia de copolímero devido à proteínas ligadas, (2) repulsão eletrostática devido às cargas das proteínas ligadas e (3) colapso local dos segmentos do copolímero sobre a superfície da proteína ligada.⁸⁶

Medidas de DLS realizadas para as misturas de gelatina ($0,50 \text{ mg mL}^{-1}$) e C2 (Figura 36A) ou C3 a 20°C revelaram dois modos de relaxação com principal pico de espalhamento obtido no modo difusivo lento. Em ambos os modos, os valores de R_H obtidos para as misturas contendo gelatina e C2 ou C3 foram, em geral, intermediários aos obtidos para os componentes puros, sugerindo ausência de interação entre os polímeros pelos mesmos motivos sugeridos para as misturas gelatina/C1.

As misturas entre gelatina ($1,25 \text{ mg mL}^{-1}$) e C2 ou C3 a 20°C apresentaram dois modos de distribuição e os valores de R_H encontrados para o modo de relaxação lento foram superiores aos obtidos para os polímeros puros, sugerindo interação entre os componentes pelos motivos mencionados anteriormente. O sistema gelatina ($1,25 \text{ mg mL}^{-1}$) e C3 apresentou perfil de distribuição das partículas similar ao obtido para o sistema gelatina($1,25 \text{ mg mL}^{-1}$)/C2 (Figura 36B).

Por outro lado, análises de DLS das misturas de gelatina ($0,50$ e $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$) e C2 ou C3 a 40°C (Tabela 20 e Figura 36 C e D) revelaram, no geral, a existência de apenas um modo de relaxação, de forma similar às misturas de gelatina/C1. Quando a gelatina esteve em menor quantidade na mistura ($0,50 \text{ mg mL}^{-1}$) não houve, aparentemente, interação entre os polímeros. Por outro lado, o maior valor de R_H para misturas contendo gelatina na concentração $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ indicou interação hidrofóbica entre os componentes, como sugerido para os sistema gelatina/C1 nesta temperatura.

Medidas de DLS de misturas de caseína ($0,50 \text{ mg mL}^{-1}$) e C1 a 20°C (Tabela 21) apresentaram diferentes valores de R_H em relação aos polímeros puros. No modo difusivo rápido não foi observado aumento no valor de R_H das misturas em relação aos polímeros puros. O perfil de distribuição dos modos de relaxação obtido para estas misturas foi semelhante à apresentada na Figura 37A para o sistema formado por caseína ($0,50 \text{ mg mL}^{-1}$)/C2. Por outro lado, os valores de R_H obtidos no modo difusivo lento foram maiores que os obtidos para os componentes puros quando a concentração de copolímero foi superior a $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$, o que sugere interação intercadeia via ligação de hidrogênio. Nesta temperatura (abaixo da LCST) o NIPAM está na forma hidrofílica, desta forma não deve ocorrer interação hidrofóbica entre este bloco e a proteína. Dois modos de relaxação também foram observados para misturas de caseína ($1,25 \text{ mg}$

mL^{-1}) e C1 a 20 °C (Tabela 21). Neste caso, porém, os valores de R_H obtidos no modo difusivo lento foram, em geral, maiores que os obtidos para os polímeros puros apenas nas duas soluções mais concentradas (2,50 e 4,00 mg mL^{-1} de C1). O perfil de distribuição dos modos de relaxação obtido para estas misturas foi semelhante à apresentada na Figura 37B para o sistema formado por caseína (0,50 mg mL^{-1})/C2. Os similares e baixos valores de R_H obtidos para a caseína em ambas as concentrações (118 e 129 nm) refletem a presença de interação entre os componentes em ambas as concentrações de proteína, diferentemente do observado no modo de relaxação lento obtido para o sistema gelatina/C1.

Tabela 21. Valores de raio hidrodinâmico obtidos para diversas misturas de caseína/copolímero a 20 e 40 °C.

Caseína/copolímero ($\text{mg mL}^{-1}/\text{mg mL}^{-1}$)	C1		C2		C3	
	20 °C	40 °C	20 °C	40 °C	20 °C	40 °C
0,50/0	19 / 118	122	19 / 118	122	19 / 118	122
0,50/0,05	19 / 113	113	13 / 98	119	121	132
0,50/0,25	8 / 128	113	10 / 105	135	16 / 126	135
0,50/0,50	11 / 137	112	15 / 122	142	10 / 133	148
0,50/0,75	11 / 125	122	11 / 118	155	12 / 135	156
0,50/1,25	12 / 123	123	13 / 127	165	16 / 138	160
0,50/2,50	11 / 129	134	24 / 137	183	19 / 140	175
0,50/4,00	11 / 125	138	16 / 167	201	16 / 163	198
1,25/0	15 / 129	21 / 117	15 / 129	21 / 117	15 / 129	21 / 117
1,25/0,05	7 / 102	111	5 / 114	116	127	117
1,25/0,25	12 / 98	110	14 / 119	129	6 / 128	126
1,25/0,50	10 / 119	118	15 / 118	141	9 / 118	148
1,25/0,75	11 / 118	120	16 / 118	152	17 / 125	151
1,25/1,25	10 / 113	125	12 / 112	160	18 / 113	159
1,25/2,50	12 / 136	138	19 / 129	181	17 / 132	179
1,25/4,00	11 / 144	137	16 / 183	213	16 / 159	207

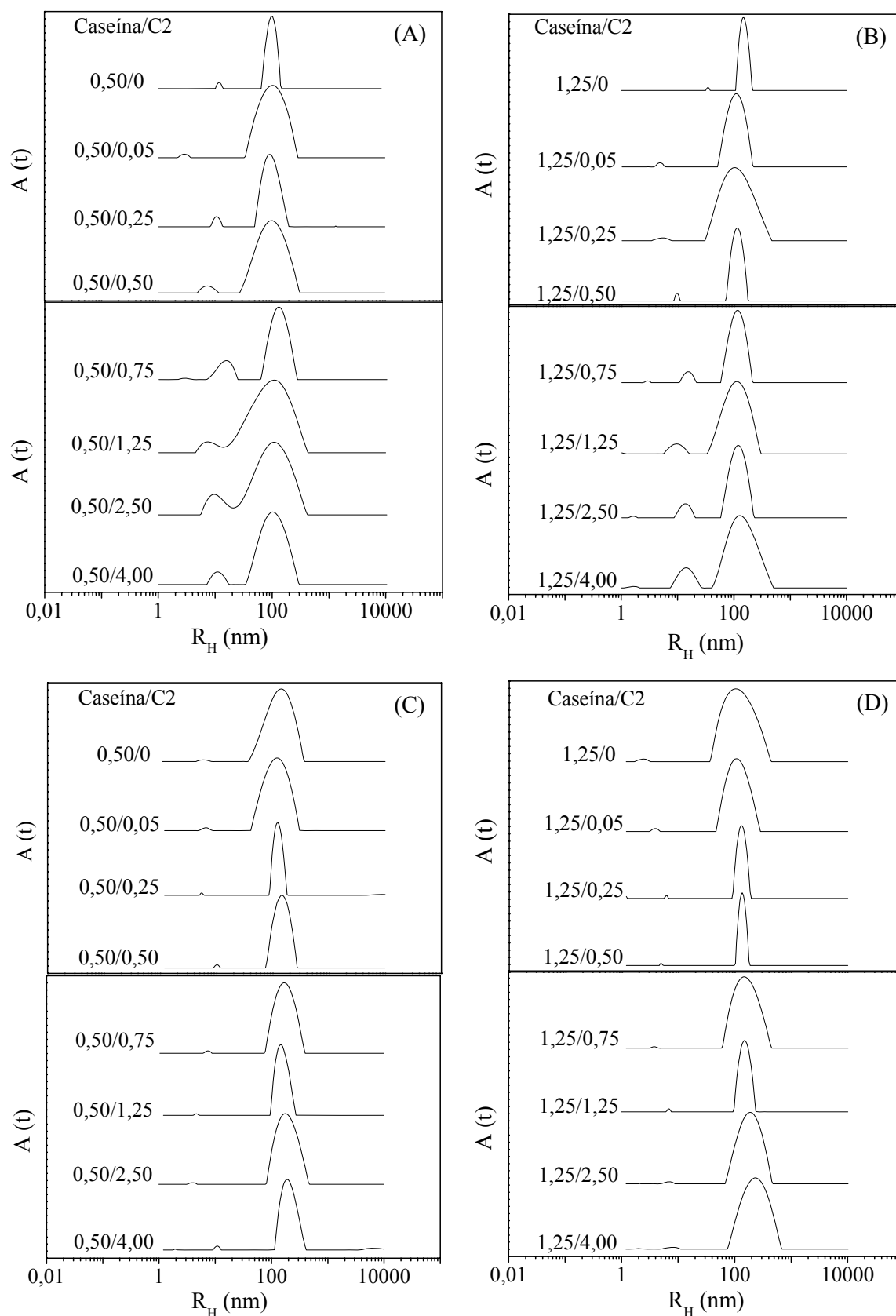


Figura 37. Distribuição dos modos de relaxação $A(t)$ a 90° obtidos para misturas de caseína/C2 a (A, B) 20 °C e a (C, D) 40 °C.

Nas misturas contendo caseína nas concentrações 0,50 e 1,25 mg mL⁻¹ e C1 analisadas a 40 °C foi observado, em geral, um aumento nos valores de R_H em relação aos polímeros puros quando a concentração de copolímero foi superior a 1,25 e 0,50, respectivamente, sugerindo interações hidrofóbicas entre as espécies em estudo. Estes sistemas apresentaram perfil similar ao observado para caseína/C2 (Figura 37C e D).

Os valores de R_H obtidos para as misturas de caseína (0,50 e 1,25 mg mL⁻¹) e C2 ou C3 nos levou as mesmas observações que as discutidas para caseína/C1 em ambas as temperaturas. Foi observado que, independente da concentração de caseína, as misturas contendo C1 apresentaram menores valores de R_H devido ao menor tamanho deste copolímero. Este resultado concorda com a literatura,²⁶⁵ onde maiores quantidades de proteína foram incorporadas em nanopartículas de poli(NIPAM-co-ácido metacrílico) quando este apresentou maior volume.

4.3.2. Proteínas/PNIPAM₇₉-PMPC₁₅₀-S-S-PMPC₁₅₀-PNIPAM₇₉

Os valores de R_H obtidos para misturas de proteína/C4 em solução aquosa a 20 e a 40 °C estão apresentados na Tabela 22. Os valores de R_H obtidos para as proteínas puras nas concentrações de 0,50 e 1,25 mg mL⁻¹ e para o copolímero em diversas concentrações foram discutidos anteriormente (Tabela 15 e Figura 31, respectivamente).

As misturas de gelatina/C4 analisadas a 20 °C apresentaram dois modos de relaxação (Figura 38 A e B), também observados nos sistemas formados por gelatina/PNIPAM_n-PMPC_m-PNIPAM_n. Os valores de R_H obtidos a 20 °C para as misturas de gelatina (ambas concentrações)/C4 no modo difusivo rápido foram, em geral, similares aos valores obtidos para a proteína pura. Por outro lado, os valores R_H referentes ao principal modo de distribuição (127 – 242 nm) foram intermediários aos obtidos para os polímeros individuais em misturas cuja concentração de gelatina foi de 0,50 mg mL⁻¹, sugerindo ausência de interação entre os polímeros. Quando a concentração de gelatina na mistura foi de 1,25 mg mL⁻¹, os valores de R_H obtidos para o principal modo de distribuição (159 - 222 nm) foram maiores que os obtidos para os polímeros individuais a 20 °C, sugerindo formação de ligações de hidrogênio entre a proteína e o bloco NIPAM. Estes resultados podem ser explicados de forma análoga ao apresentado para os sistemas contendo gelatina/copolímero no item 4.3.1.

Tabela 22. Valores de raio hidrodinâmico obtidos para diversas misturas de proteína/C4 nas temperaturas de 20 e 40 °C.

Proteína/C4 (mg mL ⁻¹ / mg mL ⁻¹)	Gelatina		Caseína	
	20 °C	40 °C	20 °C	40 °C
0,50/0,00	14 / 210	12 / 292	19 / 118	122
0,50/0,05	12 / 127	7 / 64	17 / 117	98
0,50/0,25	16 / 196	74	14 / 109	78
0,50/0,50	12 / 164	78	11 / 102	80
0,50/0,75	13 / 193	79	14 / 117	80
0,50/1,25	12 / 203	83	13 / 126	81
0,50/2,50	14 / 242	90	13 / 127	88
0,50/4,00	19 / 154	101	14 / 122	99
1,25/0,00	10 / 130	14	15 / 129	21 / 117
1,25/0,05	10 / 159	6 / 63	5 / 111	109
1,25/0,25	10 / 222	71	10 / 120	97
1,25/0,50	11 / 174	78	6 / 122	86
1,25/0,75	19 / 184	84	12 / 127	83
1,25/1,25	18 / 199	86	15 / 146	92
1,25/2,50	14 / 199	92	13 / 147	94
1,25/4,00	9 / 174	100	23 / 163	105

Os valores de R_H obtidos para as misturas formadas por gelatina/C4 analisadas a 40 °C foram similares quando comparados a soluções contendo a mesma quantidade de copolímero e diferentes concentrações de gelatina (0,50 e 1,25 mg mL⁻¹). O aumento da concentração do copolímero na mistura elevou os valores de R_H de 64 a 101 nm quando a concentração de gelatina foi de 0,50 mg mL⁻¹ e de 63 a 100 nm para soluções contendo gelatina a 1,25 mg mL⁻¹ (Figura 38 C e D). À 40 °C, os valores de R_H obtidos para os sistemas contendo menor quantidade de gelatina (0,50 mg mL⁻¹) foram intermediários aos obtidos para os polímeros puros. Por outro lado, nas misturas contendo gelatina na concentração 1,25 mg mL⁻¹ e analisadas nesta mesma temperatura foi observado um aumento dos valores de R_H em relação aos polímeros puros, sugerindo interação hidrofóbica entre a gelatina e o copolímero. A possível justificativa para estes resultados foi comentada no item 4.3.1 para os sistemas contendo gelatina e C1, C2 ou C3.

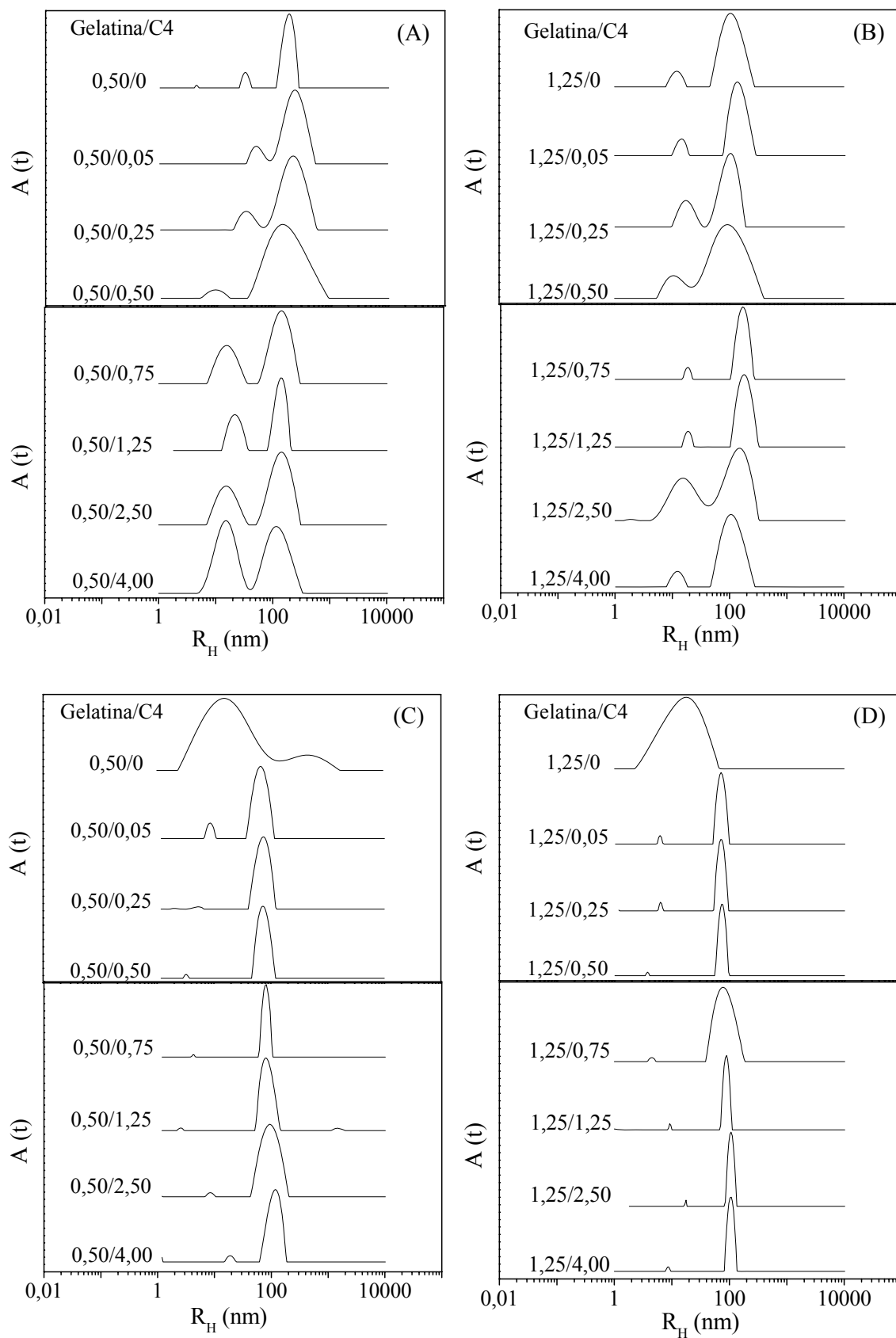


Figura 38. Distribuição dos modos de relaxação $A(t)$ a 90° obtidos para misturas de gelatina/C4 a (A, B) 20 °C e a (C, D) 40 °C.

A adição de copolímero nas misturas formadas por caseína/C4 e analisadas a 20 °C (Figura 39 A e B) modificou ambos valores de R_H em relação à solução de proteína pura. Independente da concentração de proteína, apenas as misturas contendo C4 acima de 1,25 mg mL⁻¹ apresentaram interação no modo difusivo lento. Misturas contendo caseína/PNIPAM_n-PMPC_m-PNIPAM_n apresentaram resultado similar. Por outro lado, nenhuma mistura analisada a 40 °C mostrou valor de R_H superior aos obtidos para os polímeros puros, diferentemente do observado para os demais sistemas contendo caseína e C1, C2 ou C3. O copolímero C4 (PNIPAM₇₉PMPC₁₅₀-S-S-PMPC₁₅₀-PNIPAM₇₉) apresenta pontes dissulfeto em sua estrutura, os quais são responsáveis pelo polímero adquirir forma de “flores” quando dissolvido em solução aquosa.⁵⁴ Esta arquitetura particular do copolímero “esconde” os grupos MPC, tornando difícil a interação entre estes e a caseína, cujas micelas apresentam um considerável tamanho (~ 120 nm) sendo, portanto, difícil “penetrar” na estrutura do copolímero e se ligar a este. Resultado semelhante foi observado para as misturas de gelatina (0,50 mg mL⁻¹)/C4 a 40 °C, pois a proteína apresentou valor de R_H de 292 nm. Por outro lado, as misturas de gelatina (1,25 mg mL⁻¹)/C4 analisadas a 40 °C apresentaram interação, visto que o R_H da proteína era pequeno (14 nm).

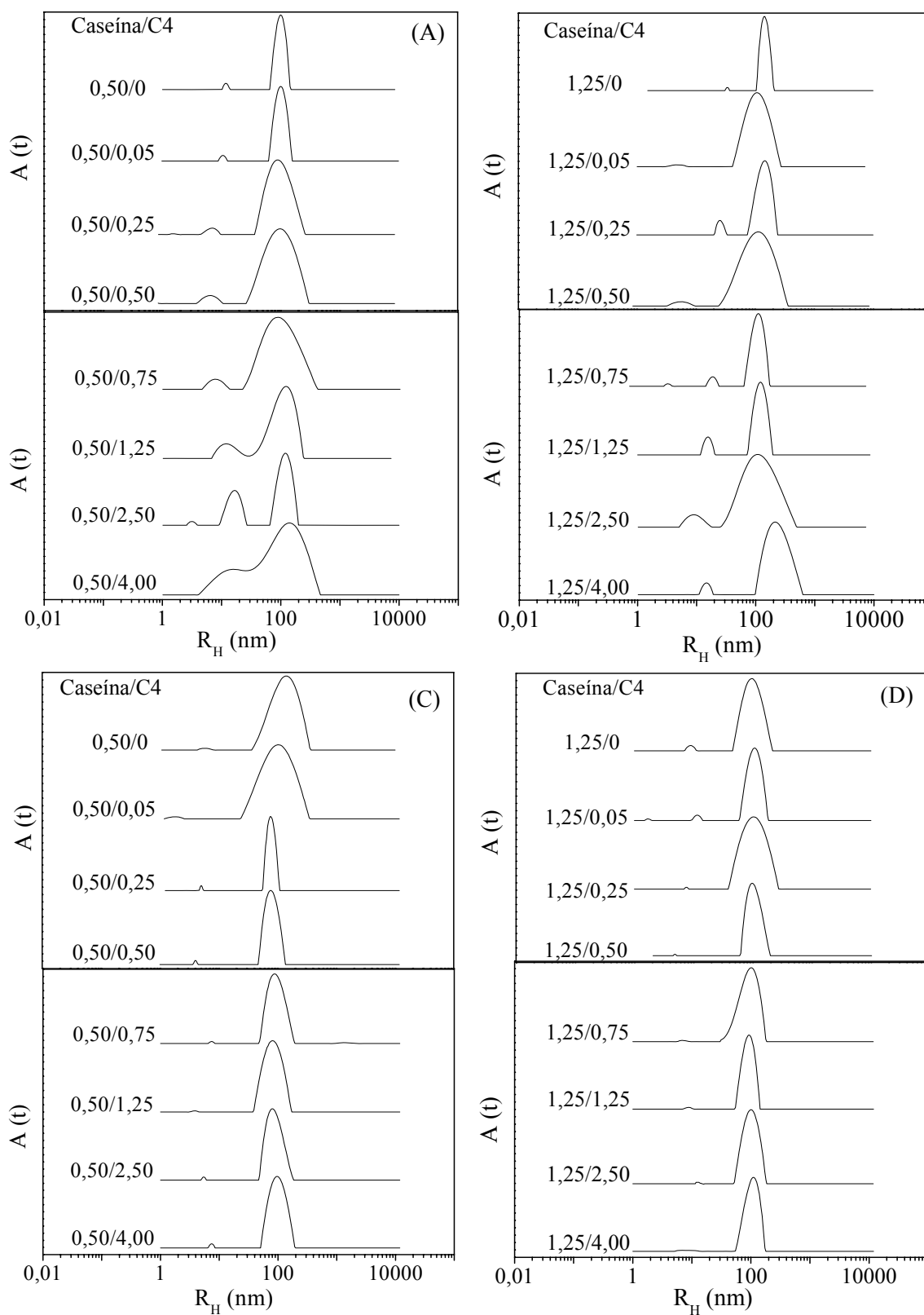


Figura 39. Distribuição dos modos de relaxação $A(t)$ a 90° obtidos para misturas de caseína/C4 a (A, B) 20 °C e a (C, D) 40 °C.

CONCLUSÕES

A massa molar média da gelatina foi da ordem de 10^5 g mol^{-1} . O filme de gelatina apresentou o maior grau de intumescimento (87,2 %) e de reticulação (90,6 %) e o maior ângulo de contato ($94,7^\circ$). Os filmes reticulados apresentaram perda de massa em meio aquoso de aproximadamente 21 %.

A permeabilidade aos vapores de água foi maior para os filmes de gelatina/caseína/EDC. Através de microscopia eletrônica de varredura foi observado que os filmes do sistema puro e com plastificante apresentaram superfície lisa, compacta e com ausência de poros.

Análise termomecânica revelou a presença de apenas uma T_g nas blendas, sugerindo miscibilidade entre os componentes nos sistemas puro, plastificado e reticulado. No geral foi observado, através de medidas de SAXS, que o aumento da quantidade de caseína na mistura reduziu a distância entre as partículas provavelmente devido a uma maior interação parcial entre os componentes.

Em relação aos ensaios mecânicos, a adição de sorbitol diminuiu os valores de TR dos filmes devido à diminuição das interações intermoleculares entre as cadeias. Os menores valores de MY obtidos para os filmes reticulados em relação ao sistema puro podem estar associados à redução da interação entre as proteínas com a presença de EDC. Filmes analisados sob atmosfera oxidante foram menos estáveis termicamente em relação aos degradados sob atmosfera inerte.

Não foi obtida uma cobertura comestível que apresentasse uma melhora em todos os parâmetros analisados. Entre os motivos que afetaram os resultados estão a não uniformidade na formação dos filmes sobre a maçã, os diferentes estágios de maturação e o tempo pós-colheita dos frutos.

O filme de gelatina reticulado apresentou permeação mais rápida do fármaco. O modelo da lei de potência foi o que melhor se adaptou ao sistema estudado, com o fármaco sendo liberado, na maioria dos filmes, pelos mecanismos de erosão e difusão.

Análises sugeriram que as células não se aderiram adequadamente nos filmes de gelatina/caseína reticulados devido a hidrofobicidade e a superfície não homogênea do filme.

Algumas misturas entre gelatina e caseína (1,25 e 0,25 – 0,75 mg mL^{-1} , respectivamente) apresentaram valores de R_H superiores aos das proteínas puras, sugerindo interação parcial entre os polímeros provavelmente via associação hidrofóbica e ligação de hidrogênio.

Os copolímeros formados por NIPAM/MPC apresentaram transição de fase (33,8 °C) com o aumento da temperatura devido a associação das cadeias hidrofóbicas do NIPAM. A auto-associação dos copolímeros foi avaliada também por medidas de MET e fluorescência. Cinéticas de equilíbrio termodinâmico, avaliadas em função do espalhamento de luz normalizado, foram dependentes da temperatura.

Medidas de DLS revelaram redução do tamanho das micelas formadas pelos copolímeros com o aumento do pH. Medidas de DSC revelaram a presença de duas Tg's para a amostra C4, enquanto os demais copolímeros analisados apresentaram no máximo uma Tg.

Interações via ligação de hidrogênio foram observadas entre misturas de gelatina 1,25 mg mL⁻¹ e copolímero a 20 °C. No geral, interações hidrofóbicas entre os componentes foram observados a 40 °C apenas quando a concentração de gelatina na mistura foi de 1,25 mg mL⁻¹, provavelmente devido à maior entropia da mistura.

Misturas de caseína e copolímero a 20 °C apresentaram interações nas soluções mais concentradas. Nos sistemas contendo caseína e C1, C2 ou C3 analisados a 40 °C foi observado, na maioria das misturas, interação hidrofóbica entre os componentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. *Organic Chemistry*. 7ª ed. John Wiley & Sons. New York, USA. 1258 p. 2000.
2. CREIGHTON, T. E. *Proteins, Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman and Company. New York, USA. 507 p. 1996.
3. GENNADIOS, A. *Protein-based films and coatings*. CRC Press. Flórida, USA. 650 p. 2002.
4. VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. W. *Fundamentos de Bioquímica*. Artmed. São Paulo. 931 p. 2000.
5. CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J. L. ; GUILBERT, S. *Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties*. Journal of Food Science, 60, 1369-1374, 1995.
6. CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. *Proteins as agricultural polymers for packaging production*. Cereal Chemistry, 75, 1-9, 1998.
7. JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; PRODPRAN, T.; TANAKA, M. *Characterization of edible films from skin gelatin of brown stripe red snapper and big eye snapper*. Food Hydrocolloids, 20, 492-501, 2006.
8. BUDAVARI, S. *Merck Index*. 12ª ed. Whitehouse Station. New Jersey, USA. 1996.
9. STEVENS, P. V. *Trace bio-organic constituents of gelatins: a review*. Food Australia, 44, 320-324, 1992.
10. POTTER, N. N.; HOTCHKISS, J. H. *Food Science*. 7ª ed. Gaithersburg. Aspen, USA. 1998.

11. VEIS, A. *The Macromolecular Chemistry of Gelatin*. Academic Press. New York and London. 1964.
12. ALAIS, C.; LINDEN G. *Food Biochemistry*. Ellis Horwood. West Sussex, UK. 1991.
13. McCORMICK-GOODHART, M. H. *Research Techniques in Photographic Conservation*. Proceedings of the Copenhagen Conference, 65-70, 1995.
14. GENNADIOS, A.; MCHUGH, T. H.; WELLER, C. L.; KROCHTA, J. M. *Edible coating and films based on proteins*. In: KROCHTA, J. M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. O. *Edible coatings and to improve food quality*. Technomic publishing Company, Lancaster, Cap. 9, 210-278, 1994.
15. BAILEY, A. J.; LIGHT, N.D. *Genes, biosynthesis and degradation of collagen in Connective tissue in meat and meat products*. Elsevier Applied Science. London and New York. 1989.
16. BAILEY, A. J.; PAUL, R.G. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 82, 104-110, 1998.
17. COLE, C. G. B. *Gelatine: its properties and its applications in dairy products*. Dairy symposium, Gordons Bay, South Africa, 2001.
18. LEUENBERGER, B. H. *Investigation of the viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins*. Food Hydrocolloids, 5, 353-361, 1991.
19. KOZLOV, P. V.; BURDYGINA, G.I. *The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification*. Polymer, 24, 651-666, 1983.
20. McWILLIAMS, M. *Foods-Experimental Perspectives*. 4^a ed. Englewood Cliffs. New Jersey, USA. 2001.
21. *Methods for sampling and testing gelatine*. British Standards Institution. 2 Park St. London, 1975.

22. IGOE, R.S. *Dictionary of Food Ingredients*. Van Nostrand Reinhold. New York, USA. 1983.
23. GASS, T. *Petition for amending the National List of the USDA's National Organic Program*. Washington, DC. 2001.
24. PETERSON, E. M.; JOHNSON, A. *Encyclopedia of Food Science*. Westport, CT. 1978.
25. LEE, Y.C.; LEE S.W. *Quality changes during storage in Korean clear pear juices concentrated by three methods*. Journal of Food Quality, 22, 565-571, 1999.
26. SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; HUBINGER, M. D.; ROQUES, M. A. *Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films*. Food Hydrocolloids, 15, 423-432, 2001.
27. McCORMICK, R. *Exploiting the Novel Properties of Pectin and Gelatin Gels*. Prepared Foods, 5, 204-205, 1987.
28. NAGHSKI, J. *Processing and utilization of hides and skins*, in I. A. WOLFF: CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture. I: Animal Products, 573-605, 1982.
29. PHADUNGATH, C. *Casein micelle structure: a concise review*. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 27, 201-212, 2005.
30. LUCEY, J. A.; SRINIVASAN, M.; SINGH, H.; MUNRO, P. A. *Characterization of commercial and experimental sodium caseinates by multiangle laser light scattering and size-exclusion chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 1610-1616, 2000.
31. HORNE, D. S. *Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products*. International Dairy Journal, 8, 171-177, 1998.

32. DAUPHAS, S.; MOUHOUS-RIOU, N.; METRO, B.; MACKIE, A. R.; WILDE, P. J.; ANTON, M.; RIAUBLANC, A. *The supramolecular organisation of β -casein: effect on interfacial properties*. Food Hydrocolloids, 19, 387-393, 2005.
33. NIÑO, M. R. R.; SÁNCHEZ, C. C.; PATINO, J. M. R. *Interfacial characteristics of b-casein spread films at the air-water interface*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 12, 161-173, 1999.
34. CREAMER, L. K. *Casein nomenclature, structure and association properties*. In: ROGINSKI, H.; FULQUAY, J. W.; FOX, P. F. Encyclopedia of Dairy Sciences: Milk Proteins. Academic Press. New York. Vol 3, 1895-1902, 2002.
35. GINGER, M. R.; GRIGOR, M. R. *Comparative aspects of milk caseins*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 124, 133-145, 1999.
36. MELLEMA, M.; LEERMAKERS, F. A. M.; KRUIF, C. G. *Molecular mechanism of the renneting process of casein micelles in skim milk, examined by viscosity and light-scattering experiments and simulated by model SCF calculations*. Langmuir, 15, 6304-6313, 1999.
37. McHUGH T. H.; KROCHTA, J. M. *Milk protein-based edible films and coatings*. Food Technology, 48, 97-103, 1994.
38. BULGARELLI, E.; FORNI, F.; BERNABEI, M. T. *Effect of matrix composition and process conditions on casein-gelatin beads floating properties*. International Journal of Pharmaceutics, 198, 157-165, 2000.
39. JAYAKRISHNAN, A.; KNEPP, W. A.; GOLDBERG, E. P. *Casein microspheres: preparation and evaluation as a carrier for controlled drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 106, 221-228, 1994.
40. CHEN, Y.; WILLMOTT, N.; ANDERSON, J.; FLORENCE, A.T. *Comparison of albumin and casein microspheres as a carrier for doxorubicin*. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 39, 978-985, 1987.

41. MULLER-BUSCHBAUM, P.; GEBHARDT, R.; MAURER, E.; BAUER, E.; GEHRKE, R.; DOSTER, W. *Thin casein films as prepared by spin-coating: influence of film thickness and of pH*. Biomacromolecules, 7, 1773-1780, 2006.
42. JEONG, B.; GUTOWSKA, A. *Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications*. Trends in Biotechnology, 20, 305-311, 2002.
43. GIL, E. S.; HUDSON, S. M. *Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates*. Progress in Polymer Science, 29, 1173-1222, 2004.
44. NAGARSEKAR, A.; CRISSMAN, J.; CRISSMAN, M.; FERRARI, F.; CAPPELLO, J.; GHANDEHARI, H. Genetic Engineering of Stimuli-Sensitive Silkelastin-like Protein Block Copolymers. Biomacromolecules, 4, 602-607, 2003.
45. ZHAO, C.; ZHUANG, X.; HE, C.; CHEN, X.; JING, X. *Synthesis of novel thermo- and pH-responsive poly(L-lysine)-based copolymer and its micellization in water*. Macromolecular Rapid Communications, 29, 1810-1816, 2008.
46. ZAREIE, H. M.; BULMUS, E. V.; GUNNING, A. P.; HOFFMAN, A. S.; PISKIN, E.; MORRIS, V. J. *Investigation of a stimuli-responsive copolymer by atomic force microscopy*. Polymer, 41, 6723-6727, 2000.
47. CHATERJI, S.; KWON, I. K.; PARK, K. *Smart polymeric gels: Redefining the limits of biomedical devices*. Progress in Polymer Science, 32, 1083-1122, 2007.
48. SCHILD, H. G. *Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application*. Progress in Polymer Science, 17, 163-249, 1992.
49. SERSHEN, S.; WEST, J. *Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 1225-1235, 2002.
50. WU, C.; WANG, X. *Globule-to-coil transition of a single homopolymer chain in solution*. Physical Review Letters, 80, 4092-4094, 1998.

51. LEWIS, A. L. *Phosphorylcholine-based polymers and their use in the prevention of biofouling*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 18, 261-275, 2000.
52. NAKAYA, T.; LI, Y-J. *Phospholipid polymers*. Progress in Polymer Science, 24, 143-181, 1999.
53. LI, C.; TANG, Y.; ARMES, S. P.; MORRIS, C. J.; ROSE, S. F.; LLOYD, A. W.; LEWIS, A. L. *Synthesis and characterization of biocompatible thermo-responsive gelators based on ABA triblock copolymers*. Biomacromolecules, 6, 994-999, 2005.
54. LI, C.; MADSEN, J.; ARMES, S. P.; LEWIS, A. L. *A new class of biochemically degradable, stimulus-responsive triblock copolymer gelators*. Angewandte Chemie International Edition, 45, 3510-3513, 2006.
55. KOHORI, F.; SAKAI, K.; AOYAGI, T.; YOKOYAMA, M.; SAKURAI, Y.; OKANO, T. *Preparation and characterization of thermally responsive block copolymer micelles comprising poly(N-isopropylacrylamide-b-DLlactide)*. Journal of Controlled Release, 55, 87-98, 1998.
56. LIU, X-M.; PRAMODA, K. P.; YANG, Y-Y.; CHOW, S. Y.; HE, C. *Cholesteryl-grafted functional amphiphilic poly(N-isopropylacrylamide-co-N-hydroxymethylacrylamide): synthesis, temperaturesensitivity, self-assembly and encapsulation of a hydrophobic agent*. Biomaterials, 25, 2619-2628, 2004.
57. TIAN, T.; CASTELLETTO, V.; PARRAS, P.; HAMLEY, I. W.; KING, S. M.; ROY, D.; PERRIER, S.; HOOGENBOOM, R.; SCHUBERT, U. S. *Thermo-responsive poly(methylmethacrylate)-block-poly(N-isopropyl acrylamide) block copolymers synthesized by RAFT polymerization: micellization and gelation*. Macromolecular Chemistry and Physics, 207, 1718-1726, 2006.
58. ZHANG, J. X.; QIU, L. Y.; ZHU, K. J.; JIN, Y. *Thermosensitive micelles self-assembled by novel N-isopropylacrylamide oligomer grafted polyphosphazene*. Macromolecular Rapid Communications, 25, 1563-1567, 2004.

59. CHUNG, J. E.; YOKOYAMA, M.; YAMATO, M.; AOYAGI, T.; SAKURAI, Y.; OKANO, T. *Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using block copolymers of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(butylmethacrylate)*. Journal of Controlled Release, 62, 115-127, 1999.
60. TOPP, M. D. C.; DIJKSTRA, P. J.; TALSMA, H.; FEIJEN, J. *Thermosensitive micelle-forming block copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(n-isopropylacrylamide)*. Macromolecules, 30, 8518-8520, 1997.
61. NERADOVIC, D.; HINRICHS, W. L. J.; KETTENES-VAN DEN BOSCH, J. J.; HENNINK, W. E. *Poly(N-isopropylacrylamide) with hydrolyzable lactic acid ester side groups: a new type of thermosensitive polymer*. Macromolecular Rapid Communications, 20, 577-581, 1999.
62. ZHANG, J. X.; QIU, L. Y.; JIN, Y.; ZHU, K. J. *Physicochemical characterization of polymeric micelles constructed from novel amphiphilic polyphosphazene with poly(N-isopropylacrylamide) and ethyl 4-aminobenzoate as side groups*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 43, 123-130, 2005.
63. LI, C.; TANG, Y.; ARMES, S. P.; MORRIS, C. J.; ROSE, S. F.; LLOYD, A. W.; LEWIS, A. L. *Synthesis and characterization of biocompatible thermo-responsive gelators based on ABA triblock copolymers*. Biomacromolecules, 6, 994-999, 2005.
64. GIACOMELLI, C.; LE MEN, L.; BORSALI, R.; LAI-KEE-HIM, J.; BRISSON, A.; ARMES, S. P.; LEWIS, A. L. *Phosphorylcholine-based pH-responsive diblock copolymer micelles as drug delivery vehicles: light scattering, electron microscopy and fluorescence experiments*. Biomacromolecules, 7, 817-828, 2006.
65. DU, J.; TANG, Y.; LEWIS, A. L.; ARMES, S. P. *pH-sensitive vesicles based on a biocompatible zwitterionic diblock copolymer*. Journal of the American Chemical Society, 127, 17982-17983, 2005.

66. YUAN, J.-J.; SCHMID, A. S.; ARMES, S. A.; LEWIS, A. L. *Facile synthesis of highly biocompatible poly(2-(methacryloyloxy)ethyl phosphoryl choline)-coated gold nanoparticles in aqueous solution*. *Langmuir*, 22, 11022-11027, 2006.
67. DU, J.; TANG, Y.; LEWIS, A. L.; ARMES, S. P. *pH-sensitive vesicles based on a biocompatible zwitterionic diblock copolymer*. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 17982-17983, 2005.
68. MA, Y.; TANG, Y.; BILLINGHAM, N. C.; ARMES, S. P.; LEWIS, A. L.; LLOYD, A. W.; SALVAGE, J. P. *Well-defined biocompatible block copolymers via atom transfer radical polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine in protic media*. *Macromolecules*, 36, 3475-3484, 2003.
69. LOBB, E. J.; MA, I.; BILLINGHAM, N. C.; ARMES, S. P.; LEWIS, A. L. *Facile synthesis of well-defined, biocompatible phosphorylcholine-based methacrylate copolymers via atom transfer radical polymerization at 20 °C*. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 7913-7914, 2001.
70. CHEN, X. Y.; ARMES, S. P.; GREAVES, S. J.; WATTS, J. F. *Synthesis of hydrophilic polymer-grafted ultrafine inorganic oxide particles in protic media at ambient temperature via atom transfer radical polymerization: use of an electrostatically adsorbed polyelectrolytic macroinitiator*. *Langmuir*, 20, 587-595, 2004.
71. CANEVAROLO JR, S. V. *Ciência dos polímeros*. Artliber. São Carlos. 2002.
72. MIURA, K.; KIMURA, N.; SUZUKI, H.; MIYASHITA, Y.; NISHIO, Y. *Thermal and viscoelastic properties of alginate/poly(vinyl alcohol) blends cross-linked with calcium tetraborate*. *Carbohydrate Polymers*, 39, 139-144, 1999.
73. ELIAS, H.-G. *Macromolecules: synthesis, materials and technology*. Plenum Publishing Corporation. USA. 29, 1984.

74. UYAR, T.; TONELLI, A. E.; HACALOĞLU, J. *Thermal degradation of polycarbonate, poly(vinyl acetate) and their blends*. Polymer Degradation and Stability, 91, 2960-2967, 2006.
75. ITO, E. N.; PESSAN, L. A.; HAGE JR, E.; COVAS, J. A. *Análise do desenvolvimento morfológico da blenda polimérica PBT/ABS durante as etapas de mistura por extrusão e moldagem por injeção*. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 14, 83-92, 2004.
76. CORRADINI, E.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. *Miscibility of PVC/EVA hydrolysed blends by viscosimetric, microscopic and thermal analysis*. European Polymer Journal, 33, 1651-1658, 1997.
77. NEIRO, S. M. S.; DRAGUNSKI, D. C.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. *Miscibility of PVC/PEO blends by viscosimetric, microscopic and thermal analyses*. European Polymer Journal, 36, 583-5899, 2000.
78. PAUL, D.R.; NEWMAN, S. *Polymer Blends*. Academic Press, INC. USA. 1978.
79. LUCAS, E. F.; SOARES, G. S.; MONTEIRO, E. C. *Caracterização de polímeros*. E-papers. Rio de Janeiro. 2001.
80. BASAVARAJU, K. C.; DAMAPPA, T.; RAÍ, S. K. *Preparation of chitosan and its miscibility studies with gelatin using viscosity, ultrasonic and refractive index*. Carbohydrate Polymers, 66, 357-362, 2006.
81. LI, B.; KENNEDY, J. F.; JIANG, Q. G.; XIE, B. J. *Quick dissolvable, edible and heatsealable blend films based on konjac glucomannan - gelatin*. Food Research International, 39, 544-549, 2006.
82. ZHANG, L.; YANG, G.; XIAO, L. *Blend membranes of cellulose cuoxam/casein*. Journal of Membrane Science, 103, 65-71, 1995.

83. JAGANNATH, J. H.; NANJAPPA, C.; GUPTA, D. K.; BAWA, A. S. *Mechanical and barrier properties of edible starch-protein-based films*. Journal of Applied Polymer Science, 88, 64-71, 2003.
84. FARHAT, I. A.; MOUSIA, Z.; MITCHELL, J. R. *Water redistribution during the recrystallisation of amylopectin in amylopectin/gelatin blends*. Polymer, 42, 4763-4766, 2001.
85. ROSCA, C.; POPA, M. I.; LISA, G.; CHITANU, G. C. *Interaction of chitosan with natural or synthetic anionic polyelectrolytes. 1. The chitosan-carboxymethylcellulose complex*. Carbohydrate Polymers, 62, 35-41, 2005.
86. COOPER, C. L.; DUBIN, P. L.; KAYITMAZER, A. B.; TURKSEN, S. *Polyelectrolyte-protein complexes*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 10, 52-78, 2005.
87. CLARK, K. M.; GLATZ, C. E. *Downstream Processing and Bioseparation*. American Chemical Society, Washington, DC, Cap. 9, 1990.
88. YU, A. M.; CARUSO, F. *Thin films of polyelectrolyte-encapsulated catalase microcrystals for biosensing*. Analytical Chemistry, 75, 3031-3037, 2003.
89. TAKAHASHI, D.; KUBOTA, Y.; KOKAI, K.; IZUMI, T.; HIRATA, M.; KOKUFUTA, E. *Effects of surface charge distribution of proteins in their complexation with polyelectrolytes in an aqueous salt-free system*. Langmuir, 16, 3133-3140, 2000.
90. LI, M.; WU, C. *Self-association of poly(N-isopropylacrylamide) and its complexation with gelatin in aqueous solution*. Macromolecules, 32, 4311-4316, 1999.
91. LEFEBVRE, J.; ANTONOV, Y. *Stability against aggregation of bovine casein micelles in the presence of acidic and alkaline gelatin*. Colloid and Polymer Science, 279, 434-441, 2001.
92. DICKINSON, E. *Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems*. Food Hydrocolloids, 17, 25-39, 2003.

93. SPAGNUOLO, P. A.; DALGLEISH, D. G.; GOFF, H. D.; MORRIS, E. R. *Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers*. Food Hydrocolloids, 19, 371-377, 2005.
94. DOUBLIER, J.-L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. *Protein-polysaccharide interactions*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 5, 202-214, 2000.
95. BOWMAN, W. A.; RUBINSTEIN, M.; TAN, J. S. *Polyelectrolyte-gelatin complexation: light-scattering study*. Macromolecules, 30, 3262-3270, 1997.
96. CHUN, S-W.; KIM, J-D. *A novel hydrogel-dispersed composite membrane of poly(N-isopropylacrylamide) in a gelatin matrix and its thermally actuated permeation of 4-acetamidophen*. Journal of Controlled Release, 38, 39-47, 1996.
97. LIU, Y.; GUO, R. *Interaction between casein and sodium dodecyl sulfate*. Journal of Colloid and Interface Science, 315, 685-692, 2007.
98. BANKER, G. S.; GORE, A. Y.; SWARBRICK, J. *Water vapor transmission properties of free polymer films*. Journal of pharmaceutical sciences, 18, 457-466, 1966.
99. RODRÍGUEZ, M.; OSÉS, J.; ZIANI, K.; MATÉ, J. I. *Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films*. Food Research International, 39, 840-846, 2006.
100. VEIGA-SANTOS, P.; OLIVEIRA, L. M.; CEREDA, M. P.; SCAMPARINI, A. R. P. *Sucrose and inverted sugar as plasticizer. Effect on cassava starch-gelatin film mechanical properties, hydrophilicity and water activity*. Food Chemistry, 103, 255-262, 2007.
101. LUKASIK, K. V.; LUDESCHER, R. D. *Effect of plasticizer on dynamic site heterogeneity in cold-cast gelatin films*. Food Hydrocolloids, 20, 88-95, 2006.

102. BERTAN, L. C.; TANADA-PALMU, P. S.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. *Effect of fatty acids and 'Brazilian elemi' on composite films based on gelatin*. Food Hydrocolloids, 19, 73-82, 2005.
103. LIN, W. J.; LEE, H. K.; WANG, D. M. *The influence of plasticizers on the release of theophylline from microporous-controlled tablets*. Journal of Controlled Release, 99, 415-421, 2004.
104. FUKUI, E.; MIYAMURA, N.; YONEYAMA, T.; KOBAYASHI, M. *Drug release from and mechanical properties of press-coated tablets with hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate and plasticizers in the outer shell*. International Journal of Pharmaceutics, 217, 33-43, 2001.
105. BARRETO, P. L. M.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. *Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere*. Polymer Degradation and Stability, 79, 147-152, 2003.
106. CHAMBI, H.; GROSSO, C. *Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase*. Food Research International, 39, 458-466, 2006.
107. BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A. *Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films*. Food Hydrocolloids, 21, 1285-1289, 2007.
108. VANIN, F. M.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; CARVALHO, R. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. *Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films*. Food Hydrocolloids, 19, 899-907, 2005.
109. ARVANITOYANNIS, I. S.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S-I. *Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties*. Carbohydrate Polymers, 37, 371-382, 1998.
110. ARVANITOYANNIS, I.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S-I. *Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water*. Carbohydrate Polymers, 36, 105-119, 1998.

111. BARRETO, P. L. M. *Propriedades físico-químicas de soluções formadoras e de filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol*. Florianópolis, 2003. Tese (Doutorado em Química). Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina.
112. CHICK, J; USTUNOL, Z. *Mechanical and barrier properties of lactic acid and rennet precipitated casein-based edible films*. Journal of Food Science, 63, 1024-1027, 1998.
113. TOMASULA, P. M.; YEE, W. C.; PARRIS, N. *Oxygen Permeability of Films Made from CO₂-Precipitated Casein and Modified Casein*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 634-639, 2003.
114. MAUER, L. J.; SMITH, D. E.; LABUZA, T. P. *Water vapor permeability, mechanical, and structural properties of edible beta-casein films*. International Dairy Journal, 10, 353-358, 2000.
115. ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. *Biomateriais Fundamentos e Aplicações*. Cultura Médica. 538p. 2006.
116. YOUNG, S.; WONG, M.; TABATA, Y.; MIKOS, A. G. *Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules*. Journal of Controlled Release, 109, 256-274, 2005.
117. TOMIHATA, K.; BURCZAK, K.; SHIRAKI, K.; IKADA, Y. *Cross-linking and biodegradation of native and denatured collagen*. Polymers of Biological and Biomedical Significance, 24, 275-286, 1993.
118. KOŁODZIEJSKA, I.; PIOTROWSKA, B.; BULGE, M.; TYLINGO, R. *Effect of transglutaminase and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide on the solubility of fish gelatin-chitosan films*. Carbohydrate Polymers, 65, 404-409, 2006.
119. CHEN, P-R.; KANG, P-L.; SU, W-S.; LIN, F-H.; CHENA, M-H. *The evaluation of thermal properties and in vitro test of carbodiimide or glutaraldehyde cross-linked*

- gelatin for pc 12 cells culture*. Biomedical Engineering Applications, Basis & Communications, 17, 44-49, 2005.
120. MWANGI, J. W.; OFNER, C. M. *Crosslinked gelatin matrices: release of a random coil macromolecular solute*. International Journal of Pharmaceutics, 278, 319-327, 2004.
121. KOŁODZIEJSKA I, PIOTROWSKA B. *The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin-chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimetilaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol*. Food Chemistry, 103, 295-300, 2007.
122. CHOI, Y. S.; HONG, S. R.; LEE, Y. M.; SONG, K. W.; PARK, M. H.; NAM, Y. S. *Studies on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge*. Journal of Biomedical Materials Research Applied Biomaterials, 48, 631-639, 1999.
123. LIANG, H. C.; CHANG, W. H.; LIANG, H. F.; LEE, M. H.; SUNG, H. W. *Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water soluble carbodiimide*. Journal of Applied Polymer Science, 91, 4017-4026, 2004.
124. CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. *Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde*. Food Hydrocolloids, 18, 717-726, 2004.
125. MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R. A.; VÁZQUEZ, A. *Creep of glutaraldehyde-crosslinked gelatin films*. Materials Science and Engineering A, 435-436, 681-686, 2006.
126. LIEN, S-M.; LI, W-T.; HUANG, T-J. *Genipin-crosslinked gelatin scaffolds for articular cartilage tissue engineering with a novel crosslinking method*. Materials Science & Engineering C, 28, 36-43, 2008.
127. BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N.; RUBINI, K. *Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin*. Biomaterials, 23, 4827-4832, 2002.

128. FLANAGAN, J.; FITZGERALD, R. J. *Physicochemical and nitrogen solubility properties of Bacillus proteinase hydrolysates of sodium caseinate incubated with transglutaminase pre- and post-hydrolysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 5429-5436, 2002.
129. MIWA, N.; KUMAZAWA, Y.; NAKAGOSHI, H.; SAKAGUCHI, S., inventors; Ajinomoto Co. Inc., assignee. *Method for modifying raw material milk and dairy product prepared by using the modified raw material milk*. European patent 1 197 152 A2, 2002.
130. MOTOKI, M.; ASO, H.; SEGURO, K.; NIO, N. *α_{s1} -casein film prepares using transglutaminase*. Agricultural and Biological Chemistry, 51, 993-996, 1987.
131. SOMANATHAN, N.; SUBRAMANIAN, V.; MANDAL, A. B. *Thermal stability of modified caseins*. Thermochimica Acta, 302, 47-52, 1997.
132. SOMANATHAN, N.; ARUMUGAM, V.; SANJEEVI, R. *Mechanical properties and temperature dependence of grafted casein films*. European Polymer Journal, 23, 803-807, 1987.
133. BRAULT, D.; D'APRANO, G.; LACROIX, M. *Formation of free-stading sterilized edible films from irradiated caseinates*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 2964-2969, 1997.
134. MOURA, R. A.; BANZATO, J.M. *Embalagem: acondicionamento, unitização & containerização - Manual de movimentação de materiais*. IMAM. São Paulo. v. 2, 1990.
135. CHANDRA, R.; RUSTGI, R. *Biodegradable polymers*. Progress in Polymer Science, 23, 1273-1335, 1998.
136. SAVENKOVA, L.; GERBERGA, Z.; NIKOLAEVA, V.; DZENE, A.; BIBERS, I.; KALNIN, M. *Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films*. Process Biochemistry, 35, 573-579, 2000.

137. MONTERREY, E. S.; SOBRAL, P. J. A. *Caracterização de propriedades mecânicas e óticas de biofilmes a base de proteínas miofibrilares de tilápia do nilo usando uma metodologia de superfície-resposta*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 19, 294-301, 1999.
138. HARDENBURG, R. *Wax and related coatings for horticultural products - a bibliography*. Agricultural Research Service Bulletin; United States Department of Agriculture, 51-15, 1967.
139. BALDWIN, E.; NISPEROS-CARRIEDO, M.; BAKER, R. *Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35, 509-524, 1995.
140. LU, S.; LUO, Y.; TURNER, E.; FENG, H. *Efficacy of sodium chlorite as an inhibitor of enzymatic browning in apple slices*. Food Chemistry, 104, 824-829, 2007.
141. WATADA, A. E.; QI, L. *Quality of fresh-cut produce*. Postharvest Biology and Technology, 15, 201-205, 1999.
142. BAI, J.; HAGENMAIER, R. D.; BALDWIN, E. A. *Coating selection for 'Delicious' and other apples*. Postharvest Biology and Technology, 28, 381-390, 2003.
143. MOLDÃO-MARTINS, M.; BEIRÃO-DA-COSTA, S. M.; BEIRÃO-DA-COSTA, M. L. *The effects of edible coatings on postharvest quality of the "Bravo de Esmolfe" apple*. European Food Research and Technology, 217, 325-328, 2003.
144. SAFTNER, R. A.; CONWAY, W. S.; SAMS, C. E. *Effects of postharvest calcium and fruit coating treatments on postharvest life, quality maintenance and fruit-surface injury in 'Golden Delicious' apples*. Journal of American Society for Horticultural Science, 123, 294-298, 1998.
145. SÜMNÜ, G.; BAYINDIRLI, L. *Effects of coatings on fruit quality of Amasya apples*. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 28, 501-505, 1995.

146. ARGENTA, L.C.; DENARDI, F. *Perdas físico-químicas mensais de maçãs 'Gala' e 'Fuji' durante a armazenagem em atmosfera controlada e frio convencional*. Revista Brasileira de Fruticultura, Cruz das Almas, 16, 111-118, 1994.
147. TORRES, J. A. *Edible films and coatings from proteins. Food Proteins and their applications*. Marcel and Dekker. New York, USA. 467-507, 1997.
148. PIERGIOVANNI, L. *Materiais de embalagem e tecnologias de envase*. Fundamentos de Tecnologia de Alimentos. Atheneu. São Paulo. v. 3, 219-279, 1998.
149. SANJURJO, K.; FLORES, S.; GERSCHENSON, L.; JAGUS, R. *Study of the performance of nisin supported in edible films*. Food Research International, 39, 749-754, 2006.
150. BEN-YEHOSHUA, S. *Gas exchange, transportation, and the commercial deterioration in storage of orange fruit*. Journal of the American Society of Horticultural Science, 94, 524-528, 1969.
151. AZEREDO, H. M. C.; FARIA, J. A. F.; AZEREDO, A. M. C. *Embalagens Ativas para Alimentos*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 20, 337-341, 2000.
152. SOBRAL, P. J. A.; MENAGALLI, F. C.; HUBINGER, M. D.; ROQUES, M. A. *Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films*. Food Hydrocolloids, 15, 423-432, 2001.
153. HAMAGUCHI, P. Y.; WUYIN, W.; TANAKA, M. *Effect of pH on the formation of edible films made from the muscle proteins of Blue marlin (Makaira mazara)*. Food Chemistry, 100, 914-920, 2007.
154. CHITARRA, M. F. I. *Processamento mínimo de frutas e hortaliças*. UFLA/FAEPE, Lavras, 113p, 2000.
155. KADER, A. A. *Regulation of fruit physiology by controlled/modified atmospheres*. Acta Horticulturae, 398, 139-146, 1995.

156. ROCCULI, P.; ROMANI, S.; DALLA ROSA, M.. *Evaluation of physico-chemical parameters of minimally processed apples packed in non-conventional modified atmosphere*. Food Research International, 37, 329-335, 2004.
157. LIDSTER, P. D.; FORSYTH, F. R.; LIGHTFOOT, H. J. *Low oxygen and carbon dioxide atmospheres for storage of "mcintosh" apples*. Canadian Journal of Plant Science, 60, 299-301, 1980.
158. LITTLE, C. R. *A manual of procedures for assessing apple maturity for storage schedules*. Horticulture Research Institute, Vitória, 80p, 1992.
159. Empresa de Pesquisa Agropecuária e extensão Rural de Santa Catarina (Epagri). *A cultura da macieira*. Florianópolis, 743 p, 2002.
160. CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. D. *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio*. FAEPE, Lavras, 293p, 1990.
161. CARVALHO, V. D. *Qualidade e conservação de goiabas*. Informe Agropecuário, 17, 48-54, 1994.
162. SZCZESNIAK, A.; BRANDT, M.; FREIDMAN, H. *Development of standard rating scales for mechanical parameters and correlation between the objective and sensory texture measurements*. Food Technology, 22, 50-54, 1963.
163. CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. *Elaboração de biofilmes à base de gelatina*. In: Anais do Workshop sobre Biopolímeros, Pirassununga, 94-97, 1997.
164. SOBRAL, P. J. A. *Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura*. Ciência & Engenharia, 8, 60-67, 1999.
165. CAO, N.; FU, Y.; HE, J. *Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films*. Food Hydrocolloids, 21, 1153-1162, 2007.

166. SCHOU, M.; LONGARES, A.; MONTESINOS-HERRERO, C.; MONAHAN, F. J.; O'RIORDAN, D.; O'SULLIVAN, M. *Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping*. LWT, 38, 605-610, 2005.
167. KROCHTA, J. M.; PAVLATH, A. E.; GOODMAN, N. *Edible filmes from casein-lipid emulsions for lightly-processed fruits and vegetables*. In Engineering and Food, vol 2, Elsevier Applied Science, London, 329-340, 1990.
168. KHWALDIA, K.; PEREZ, C.; BANON, S.; DESOBRY, S.; HARDY, J. *Milk proteins for edible films and coatings*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44, 239-251, 2004.
169. LACROIX, M.; JOBIN, M.; MEZGHENI, E.; SROUR, M.; BOILEAU, S. *Polymerization of calcium caseinates solutions induced by gamma irradiation*. Radiation Physics and Chemistry, 52, 223-227, 1998.
170. MAUER, L. J.; SMITH, D. E.; LABUZA, T. P. *Water vapor permeability, mechanical, and structural properties of edible β -casein films*. International Dairy Journal, 10, 353-358, 2000.
171. SÁEZ, V.; HERNÁEZ, E.; ANGULO, L. S.; KATIME, I. *Liberación controlada de fármacos. Micropartículas*. Revista Iberoamericana de Polímeros, 5, 87-101, 2004.
172. AZEVEDO, M. M. M. *Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos*. Campinas, 2002. Monografia. Laboratório de Química do Estado Sólido, Instituto de Química, UNICAMP.
173. MAIBACH, H. I. *Toxicology of skin*, Taylor & Francis, Philadelphia, 2001.
174. MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. *Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 38, 33-54, 2002.

175. FIALHO, S. L.; REGO, M. G. B.; CARDILLO, J. A.; SIQUEIRA, R. C.; JORGE, R.; CUNHA JÚNIOR, A. S. *Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular*. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia, 66, 891-896, 2003.
176. LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. *Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 41, abr./jun., 2005.
177. OLIVEIRA, R. B.; LIMA E. M. *Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos*. Revista Eletrônica de Farmácia, 3, 29-35, 2006.
178. ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; JR, L. A. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 6 ed., Editorial Premier, São Paulo, 2000.
179. ATKINS, P.W. *Físico-Química*. 6 ed., LTC-Editora S.A., Rio de Janeiro, v. 3, 1997.
180. PHUAPRADIT, W.; SHAN, N. H.; WILLIAMS, L.; INFELD, M. H. *In vitro characterization of polymeric membrane used for controlled release application*. Drug development and Industrial Pharmacy, 21, 955-963, 1995.
181. STULZER, H. K.; SILVA, M. A. S. *Desenvolvimento e avaliação de comprimidos de captopril de liberação prolongada*. Latin American Journal of Pharmacy, 26, 259-65, 2007.
182. RITGER, P.; PEPPAS, N.A. *A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices*. Journal of Controlled Release, 5, 37-42, 1987.
183. PEPPAS, N. A. *Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers*. Pharmaceutisch Acta Helvética, 60, 110-111, 1985.
184. COSTA, P. J. C. *Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 38, 141-153, 2002.

185. LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. *Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 41, 143-154, 2005.
186. SATO, M. E. O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I. F.; ZARONI, M.. *Permeação cutânea in vitro do ácido kójico*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 43, 195-203, 2007.
187. SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. *Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos*. Química Nova, 26, 726-737, 2003.
188. HIGUCHI, T. *Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 50, 874-875, 1961.
189. KALIA, Y. N.; GUY, R. H. *Modeling transdermal drug release*. Advanced Drug Delivery Reviews, 48, 159-172, 2001.
190. MIYAZAKI, S.; KUBO, W.; ITOH, K.; KONNO, Y.; FUJIWARA, M.; DAIRAKU, M.; TOGASHI, M.; MIKAMI, R.; ATTWOOD, D. *The effect of taste masking agents on in situ gelling pectin formulations for oral sustained delivery of paracetamol and ambroxol*. International Journal of Pharmaceutics, 297, 38-49, 2005.
191. GRASSI, M.; VOINOVICH, D.; MONEGHINI, M.; FRANCESCHINIS, E.; PERISSUTTI, B.; FILIPOVIC-GRCIC, J. *Preparation and evaluation of a melt pelletised paracetamol/stearic acid sustained release delivery system*. Journal of Controlled Release, 88, 381-391, 2003.
192. DONG, Z.; WANG, Q.; DU, Y. *Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release*. Journal of Membrane Science, 280, 37-44, 2006.
193. BONFERONI, M. C.; CHETONI, P.; GIUNCHEDI, P.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BURGALASSI, S.; CARAMELLA, C. *Carrageenan-gelatin mucoadhesive systems for*

- ion-exchange based ophthalmic delivery: in vitro and preliminary in vivo studies. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 465-472, 2004.
194. KUIJPERS, A. J.; van WACHEM, P. B.; van LUYN, M. J. A.; BROUWER, L. A.; ENGBERS, G. H. M.; KRIJGSVELD, J.; ZAAT, S. A. J.; DANKERT, J.; FEIJEN, J. *In vitro and in vivo evaluation of gelatin-chondroitin sulphate hydrogels for controlled release of antibacterial proteins. Biomaterials*, 21, 1763-1772, 2000.
195. YAO, K. D.; YIN, Y. J.; XU, M. X.; WANG, Y. F. *Investigation of pH-sensitive drug delivery system of chitosan/gelatin hybrid polymer network. Polymer International*, 38, 77-82, 2003.
196. VANDELLI, M. A.; RIVASI, F.; GUERRA, P.; FORNI, F.; ARLETTI, R. *Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterisation, in vitro and in vivo studies. International Journal of Pharmaceutics*, 14, 175-84, 2001.
197. GOHEL, M. C.; SUMITRA G, M. *Modulation of active pharmaceutical material release from a novel 'tablet in capsule system' containing an effervescent blend. Journal of Controlled Release*, 79, 157-164, 2002.
198. LATHA, M. S.; LAL, A. V.; KUMARY, T. V.; SREEKUMAR, R.; JAYAKRISHNAN, A. *Progesterone release from glutaraldehyde cross-linked casein microspheres: in vitro studies and in vivo response in rabbits. Contraception*, 61, 329-334, 2000.
199. BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. *Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15, 13-21, 2005.
200. GRIFFITH, L. G.; NAUGHTON, G. *Tissue engineering - current challenges and expanding opportunities. Bobby Building: The Bionic Human*, 295, 1009-1016, 2002.
201. STOCK, U. A.; VACANTI, J. P. *Tissue engineering: current state and prospects. Annual Review of Medicine*, 52, 443-51, 2001.

202. ANSELME, K. *Osteoblast adhesion on biomaterials*. Biomaterials, 21, 667-681, 2000.
203. BARBETTA, A; MASSIMI, M.; DEVIRGILIIS, L. C.; DENTINI, M. *Enzymatic cross-linking versus radical polymerization in the preparation of gelatin polyHIPEs and their performance as scaffolds in the culture of hepatocytes*. Biomacromolecules, 7, 3059-3068, 2006.
204. KANG, H-W; TABATA, Y.; IKADA, Y. *Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering*. Biomaterials, 20, 1339-1344, 1999.
205. KIM, S. S.; KIM, H. W.; YUK, S. H.; OH, S. Y.; PAK, P. K.; LEE, H. B. *Blood and cell compatibility of gelatin-carrageenan mixtures cross-linked by glutaraldehyde*. Biomaterials, 17, 813-821, 1996.
206. HONG, S. R.; CHONG, M. S.; LEE, S. B.; LEE, Y. M.; SONG, K. W.; PARK, M. H.; HONG, S. H. *Biocompatibility and biodegradation of cross-linked gelatin/hyaluronic acid sponge in rat subcutaneous tissue*. Journal of Biomaterials Science, 15, 201-214, 2004.
207. CHOI, Y. S.; HONG, S. R.; LEE, Y. M.; SONG, K. W.; PARK, M. H.; NAM, Y. S. *Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge*. Biomaterials, 20, 409-417, 1999.
208. KITTITHEERANUN, P.; POTIYARAJ, P.; BUNAPRASERT, T.; SANCHAVANAKIT, N.; DUBAS, S. T. *Improved L-929 cell growth from self assembled PDADMAC/gelatin thin films*. Journal of Metals, Materials and Minerals, 18, 39-45, 2007.
209. SILVA, G. A.; VAZ, C. M.; COUTINHO, O. P.; CUNHA, A. M.; REIS, R. L. *In vitro degradation and cytocompatibility evaluation of novel soy and sodium caseinate-based membrane biomaterials*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 14, 1055-1066, 2003.

210. BAJPAI, A.; SAINI, R. *Preparation and characterization of spongy cryogels of poly(vinyl alcohol)-casein system: water sorption and blood compatibility study*. Polymer International, 54, 796-806, 2005.
211. ZHAO, W. B. *Polymer Data Handbook*. Copyright © 1999 by Oxford University Press, Inc.
212. BUBNIS, W. A.; OFNER III, C. M. *The determination of ϵ -amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid*. Analytical Biochemistry, 207, 129-133, 1992.
213. GLATTER, O.; KRATKY, O. *Small angle X-ray scattering*, Academic Press, London, 1982.
214. NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. O Instituto, São Paulo, 3 ed., 1985.
215. W. BROWN, ED. *Dynamic Light Scattering. The Method and Some Applications*, Oxford University Press Inc., New York, 1993.
216. PORTO, L. C.; CRISTIANO, C. M. Z.; LIMA, A. M. F.; SOLDI, V. *Films based on gelatin and poly (acrylamide-co-acrylic acid): effects of composition, plasticizer and crosslinking agents on thermal, mechanical and water absorption properties*. submetido.
217. LIVNEY, Y. D.; SCHWAN, A. L.; DALGLEISH, D. G. J. *A study of β -casein tertiary structure by intramolecular crosslinking and mass spectrometry*. Journal of Dairy Science, 87, 3638-3647, 2004.
218. CHEN, H. *Functional properties and applications of edible films made of milk proteins*. Journal of Dairy Science, 78, 2563-2583, 1995.

219. LOURDIN, D.; COIGNARD, L.; BIZOT, H.; COLONNA, P. *Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials*. Polymer, 38, 5401-5406, 1997.
220. CHANG, Y. P.; CHEAH, P. B.; SEOW, C. C. *Plasticizing antiplasticizing effects of water on physical properties of tapioca starch films in the glassy state*. Journal of Food Science, 65, 445-451, 2000.
221. RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. *Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan*. Journal of Food Engineering, 90, 531-539, 2009.
222. PIOTROWSKA, B.; SZTUKA, K.; KOŁODZIEJSKA, I.; DOBROSIELSKA, E. *Influence of transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) on the properties of fish-skin gelatin films*. Food Hydrocolloids, 22, 1362-1371, 2008.
223. BHASKAR, G.; FORD, J. L.; HOLLINGSBEE, D. A. *Thermal analysis of the water uptake by hydrocolloids*. Thermochimica Acta, 322, 153-165, 1998.
224. KALICHEVSKY, M.T.; BLANCHARD, J. M. V.; TOKARCZYK, P. F. *Effect of water content and sugars on the glass transition of casein and sodium caseinate*. Internacional Journal Food Science and Technology, 28, 139-151, 1993.
225. ARVANITOYANNIS, I.; PSOMIADOU, E.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S.; YAMAMOTO, N. *Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3*. Food Chemistry, 60, 593-604, 1997.
226. GUINIER, A.; FOURNET, G. *Small Angle Scattering of X-Ray*, Ed. Wiley, New York, 1955.
227. PRANOTO, Y.; LEE, C. M.; PARK, H. J. *Characterizations of fish gelatin films added with gellan and k-carrageenan*. LWT, 40, 766-774, 2007.

228. CHIELLINI, E.; CINELLI, P.; FERNANDES, E. G.; KENAWY, ERS.; LAZZERI, A. *Gelatin-based blends and composites. Morphological and thermal mechanical characterization*. Biomacromolecules, 2, 806-811, 2001.
229. KHIN, M. M.; ZHOU, W.; YEO, S. Y. *Mass transfer in the osmotic dehydration of coated apple cubes by using maltodextrin as the coating material and their textural properties*. Journal of Food Engineering, 81, 514-522, 2007.
230. CORRENT, A. R.; GIRARDI, C. L.; PARUSSOLO, A.; TOMAZZI, R.; FRONZA, E.; ROMBALDI, C. V. *Efeito do 1-metilciclopropeno em maçãs 'fuji' armazenadas em atmosfera refrigerada e atmosfera controlada*. Revista Brasileira de Agrociência, 11, 91-94, 2005.
231. Empresa de Pesquisa Agropecuária e extensão Rural de Santa Catarina (Epagri). *A cultura da macieira*. Florianópolis, 743 p, 2002.
232. ARGENTA, L. C.; BENDER, R. J.; KREUZ, C. L.; MONDARDO, M. *Padrões de maturação e índices de colheita de maçãs cvs. Gala, Golden Delicious e Fuji*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 30, 1258-1266, 1995.
233. BRACKMANN, A.; BORTOLUZ, L.; BORTOLUZZI, G. *Frigoconservação de maçã 'Fuji' em duas temperaturas e em atmosfera controlada*. Revista Brasileira de Agrociência, 4, 26-30, 1998.
234. GOULARTE, V. D. S.; ANTUNES, P. L. *Caracterização físico química de maçãs fuji concentradas com açúcares e desidratadas*. Revista Brasileira de Agrociência, 5, 149-151, 1999.
235. RODRIGUES, C. Q.; LIMA, E. D. P. A.; ALMEIDA, E. C. *Caracterização físico-química de maçã Fuji (malus domestica borkh) e rendimento no processo de desidratação*. I Jornada nacional da agroindústria, Bananeiras, 17 a 20 de outubro de 2006.

236. BARRETO, P. L. M.; BEIRÃO, L. H. *Influência do amido e carragena nas propriedades texturiais de surimi de tilápia (Oreochromis sp.)*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 19, 183-188, 1999
237. LEE, C. M.; CHUNG, K. H. *Analysis of surimi gel properties by compression and penetration tests*. Journal of Texture Studies, 20, 363-377, 1989.
238. PINHO, F. O.; JOAZEIRO, P. P.; SANTOS JR., A. R. *Avaliação do crescimento e diferenciação de células osteoblásticas humanas sobre matriz óssea desmineralizada (MOD)*. Congresso Latino Americano de Biomateriais, Campinas, 164, 2004.
239. MA, Z.; GAO, C.; GONG, Y.; SHEN, J. *Chondrocyte behaviors on poly-L-lactic acid (PLLA) membranes containing hydroxyl, amide or carboxyl groups*. Biomaterials, 24, 3725-3730, 2003.
240. WAN, Y.; YANG, J.; YANG, J.; BEI, B.; WANG, S. *Cell adhesion on gaseous plasma modified poly- (L-lactide) surface under shear stress field*. Biomaterials, 24, 3757-3764, 2003.
241. TEZCANER, A.; BUGRA, K.; HASIRCI, V. *Retinal pigment epithelium cell culture on surface modified poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) thin films*. Biomaterials, 24, 4573-4583, 2003.
242. YAMAGUCHI, M.; SHINBO, T.; KANAMORI, T.; WANG, P-C.; NIWA, M.; KAWAKAMI, H.; NAGAOKA, S.; HIRAKAWA, K.; KAMIYA, M. *Surface modification of poly(L-lactic acid) affects initial cell attachment, cell morphology, and cell growth*. Artificial Organs, 7, 187-193, 2004.
243. KETTERING, J. D.; TORABINEJAB, M. *Cytotoxicity of root canal sealers: a study using HeLa cells and fibroblasts*. International Endodontic Journal, 17, 60-66, 1984.
244. BERRY, C.; CAMPPBELL, G.; SPADICINO, A.; ROBERTSON, M.; CURTIS, A. S. *The Influence of Microscale Topography on Fibroblast Attachment and Motility*. Biomaterials, 25, 5781-5788, 2004.

245. ZHANG, G.; JIANG, M.; ZHU, L.; WU, C. *Intermacromolecular complexation because of specific interactions 11. Ionic interaction complexation and its comparison with hydrogen-bonding complexation*. Polymer, 42, 151-159, 2001.
246. REN, S. Z.; SHI, W. F.; ZHANG, W. B.; SORENSSEN, C. M. *Anomalous diffusion in aqueous solutions of gelatin*. Physical Review A, 45, 2416-2422, 1992.
247. BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. *Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films*. Biomaterials, 25, 5675-5680, 2004.
248. WETZEL, R. *For protein misassembly, minireview it's the "I" decade*. Cell, 86, 699-702, 1996.
249. PHADUNGATH, C. *Casein micelle structure: a concise review*. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 27, 201-212, 2005.
250. HESKINS, M.; GUILLET, J. E. *Solution properties of poly (N-isopropylacrylamide)*. Journal of Macromolecular Science, Part A Pure and Applied Chemistry. A2, 1441-1455, 1968.
251. TAKEDA, N.; NAKAMURA, E.; YOKOYAMA, M.; OKANO, T. *Temperature-responsive polymeric carriers incorporating hydrophobic monomers for effective transfection in small doses*. Journal of Controlled Release, 95, 343-355, 2004.
252. DOWDING, P. J.; VINCENT, B.; WILLIAMS, E. *Preparation and swelling properties of poly(NIPAM) "minigel" particles prepared by inverse suspension polymerization*. Journal of Colloid and Interface Science, 221, 268-272, 2000.
253. XIN, X.; WANG, Y.; LIU, W. *Synthesis of zwitterionic block copolymers via RAFT polymerization*. European Polymer Journal, 41, 1539-1545, 2005.
254. NIU, A.; LIAW, D.-J.; SANG, H.-C.; WU, C. *Light-scattering study of a zwitterionic polycarboxybetaine in aqueous solution*. Macromolecules, 33, 3492-3494, 2000.

255. FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. *Princípios físico-químicos em farmácia*: EdUSP, São Paulo, 1998.
256. MANO, V.; SILVA, M. L. S. R.; BARBANI, N.; GIUSTI, P. *Blends composed of poly(N-isopropylacrylamide) and an ethylene/vinyl alcohol copolymer: thermal and morphological studies*. Journal of Applied Polymer Science, 91, 501–505, 2004.
257. KALYANASUNDARAN, K.; THOMAS, J. K. *Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems*. Journal of the American Chemical Society, 99, 2039-204, 1977.
258. CAMAS, S.; MATSUMOTO, T.; OKANO, T.; SAKURAI, Y.; KATAOKA, K. *Design of functional polymeric micelles as site-specific drug vehicles based on poly (α -hydroxy ethylene oxide-co- β -benzyl L-aspartate) block copolymers*. Materials Science & Engineering C, 4, 241-247, 1997.
259. HOSHI, T.; MATSUNO, R.; SAWAGUCHI, T.; KONNO, T.; TAKAI, M.; ISHIHARA, K. *Protein adsorption resistant surface on polymer composite based on 2D- and 3D-controlled grafting of phospholipid moieties*. Applied Surface Science, 255, 379-383, 2008.
260. SAWADA, S.; SHINDO, Y.; SAKAKI, S.; WATANABE, A.; IWASAKI, Y.; KATO, S.; AKASHI, M.; ISHIHARA, K.; NAKABAYASHI, N. *Perfect inhibition of inflammatory reaction on medical devices by coating with novel phospholipids polymer*. Transactions of the Society for Biomaterials, 25, 231, 1999.
261. KAWAGUCHI, H.; KISARA, K.; TAKAHASHI, T.; ACHIHA, K.; YASUI, M.; FUJIMOTO, K. *Versatility of thermosensitive particles*. Macromolecular Symposia, 151, 591-598, 2000.
262. TORMP, R. H.; ten GROTENHUIS, E.; OLIEMAN, C. *Self-aggregation of gelatine above the gelling temperature analysed by SEC-MALLS*. Food Hydrocolloids, 16, 235-239, 2002.

263. GRINBERG, V. Y.; TOLSTOGUZOV, V. B. *Thermodynamic compatibility of gelatin with some D-glucans in aqueous media*. Carbohydrate Research, 25, 313-321, 1972.
264. EDELMAN, M. W.; van der LINDEN, E.; TROMP, R. H. *Compatibility of gelatine and dextran in aqueous solution*. Biomacromolecules, 1148-1154, 2001.
265. MOSELHY, J.; WU, X. Y.; NICHOLOV, R.; KODARIA, K. *In vitro studies of the interaction of poly(NIPAm/MAA) nanoparticles with proteins and cells*. Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, 11, 123-147, 2000.